



Inhibition des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 par l'ABT-737 : intérêt pour le traitement des cancers des voies aérodigestives supérieures

Marion Gilormini

► To cite this version:

Marion Gilormini. Inhibition des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 par l'ABT-737 : intérêt pour le traitement des cancers des voies aérodigestives supérieures. Cancer. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10277 . tel-01326468

HAL Id: tel-01326468

<https://theses.hal.science/tel-01326468>

Submitted on 3 Jun 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Année 2015

UNIVERSITE LYON 1 – CLAUDE BERNARD
ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES ET SANTE
(EDISS)

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Biologie cellulaire et oncologie

Présentée et soutenue publiquement par

Marion GILORMINI

le 07 Décembre 2015

**Inhibition des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 par
l'ABT-737 : intérêt pour le traitement des cancers des voies
aérodigestives supérieures**

Jury :

Dr. Thierry Douki	Rapporteur
Dr. François Vallette	Rapporteur
Pr. Patrick Vernet	Rapporteur
Pr. Jacques Balosso	Président du Jury
Pr. Claire Rodriguez-Lafrasse	Examineur
Dr. Dominique Ardail	Directeur de thèse

*« Quand on ne sait pas,
On ne se pose pas trop de questions,
Mais quand on commence à disposer d'un début d'explication,
On veut à tout prix tout savoir, tout comprendre. »*

Bernard Werber – Les Thanatonautes

Remerciements

Je suis très reconnaissante au Professeur Jacques Balosso de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Je tiens à remercier également le Docteur François Vallette, le Docteur Thierry Douki et le Professeur Patrick Vernet d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude au Professeur Claire Rodriguez-Lafrasse pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour la confiance qu'elle m'a accordée tout au long de ces années. Je vous remercie également pour m'avoir donné l'occasion de participer à plusieurs congrès, dont le congrès européen de recherche en radiobiologie, me permettant ainsi de découvrir la très belle ville de Dublin.

Je souhaite remercier très chaleureusement le Docteur Dominique Ardail pour m'avoir encadrée pendant ces quatre années de thèse. Merci pour tes conseils et d'avoir partagé avec moi ton expérience, me permettant d'évoluer d'un point de vue scientifique et personnel.

Je remercie également toutes les personnes que j'ai rencontrées au cours de ces années pendant lesquelles j'ai travaillé au Laboratoire de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire.

Je souhaite tout d'abord remercier le Docteur Gersende Alphonse et le Docteur Delphine Poncet pour leur aide scientifique, mais également pour leurs sourires et leur joie de vivre. Grâce à vous, j'ai pu apprendre énormément et votre positivité m'a beaucoup apportée.

Un merci particulier à Gersende qui m'a aidée et soutenue pour l'écriture et les révisions de l'article JoVE. Tu es une personne d'une force incroyable et j'ai beaucoup aimé les moments que nous avons passés ensemble, au GANIL mais aussi à Lyon, avec tes petits bouts ! J'espère qu'on trouvera le temps de se refaire une après-midi « cheval » avec tes enfants ;)

Delphine, merci pour ton aide et ta disponibilité, même si je sais que tu as l'impression de n'avoir rien fait, tu m'as apporté beaucoup, et nos discussions autour d'un café ont été de vraies sources de motivations pour moi. J'espère rencontrer tes p'tits monstres un de ces 4 !

Je remercie également les techniciennes Priscillia Battiston-Montagne, Céline Malésys et Emma Armandy qui m'ont toutes prêtées main forte au cours de ces travaux. Merci pour votre disponibilité, de votre aide et pour toutes nos discussions qui ont animé mes journées pendant toutes ces années. Nos pauses tricot/couture/shopping/accompagnement-de-clope/etc vont me manquer...

Pris, un énorme MERCI pour ton soutien moral, pour ton amitié qui est sans limites et pour ta présence au quotidien à mes côtés. Ton rire et ta joie ont été une source de motivation et continueront de l'être ! Nos bons moments passés au GANIL n'ont pu que renforcer nos liens et je suis heureuse de te compter parmi mes amies.

Céline, nous avons partagé beaucoup de bons moments, le plus fort pour moi a été ta confiance concernant la venue d'Emilien parmi nous ! Je te souhaite énormément de bonheur avec tes trois petits gars (et avec tes aiguilles à tricoter) !

Emma, nous avons également partagé des moments forts, même au GANIL où nous avons eu le plaisir de pouvoir encore mieux nous connaître. Merci pour ta présence, ton oreille toujours disponible et pour tes conseils (ton panel est très étendu, cela va du Western blot aux paires de chaussures). Je te souhaite un bon courage pour tes « quelques années » avant les « grandes vacances », et qui sait, peut-être que tu vas te mettre à la couture ;))

Je remercie également le Docteur Marie-Thérèse Aloy, ma « colocataire » de bureau, qui m'a transmis son application et sa rigueur dans le travail. Merci également pour les bons moments que nous avons passés ensemble, pour votre écoute et pour votre aide tout au long de ces années.

J'ai également une pensée pour Chantal Gagnon qui est partie à la retraite et qui m'a beaucoup aidée pour la paperasse administrative. Merci aussi pour tes gâteaux, ton sourire et ta gentillesse qui me manquent déjà... Je remercie également Pauline Duvernay qui remplace désormais Chantal et qui a su s'adapter rapidement en m'aidant administrativement sur la fin de ma thèse. Merci aussi Pauline pour ton sourire et ta gentillesse.

Je souhaite également remercier tous les étudiants que j'ai croisés au sein du laboratoire.

Ma première pensée va à Annabelle, qui n'est pas restée longtemps, juste le temps de faire son M2, mais qui est devenue une véritable amie. Merci Annabelle pour ta générosité, mais aussi pour me faire sortir de mon monde des bisounours ! ;)

Je tiens également à souhaiter un bon courage à Coralie, ma binôme de thèse, qui a commencé en même temps que moi. Tu es quelqu'un de très courageux et de persévérant, alors n'abandonne pas tes rêves de faire de la médecine et de la recherche, je suis sûre que tu y arriveras.

Mes pensées vont vers mes aînés, Sylvain et Gérald. Vous m'avez beaucoup apporté et vous avez été une source de motivation lorsque rien ne fonctionnait.

Merci Sylvain pour ton humour et pour les très bons moments que nous avons passés ensemble au GANIL et à Lyon. Sans toi, la « plante-chat » et les « œufs de cochon » n'existeraient pas !

Merci Gérald le Normand pour tes conseils en CSC et pour nos pauses thés qui ont souvent été bien animées ! Je me souviendrai toujours de tes talents de chanteur et danseur au LARIA (« j'suis pas une bombe platine... »).

J'ai également une pensée vers Julie avec qui j'ai passé des moments vraiment magiques, au GANIL et en congrès. Grâce à toi, l'EBR n'a plus de secret pour moi et notre recherche de pignons restera gravée dans ma mémoire ! Merci pour ta gentillesse, j'espère que tu trouveras ton poste rapidement, mais entre nous, je ne me fais pas beaucoup de soucis pour toi !

Je me tourne maintenant vers les futures Docteurs, Anne-Sophie, Stéphanie, Alexandra et Jean-Baptiste. Je vous souhaite à tous la réussite et je vous envoie tout mon courage pour affronter les épreuves que la vie de thésards vous apportera.

Anne-Sophie, continue à être une battante, tout le travail que tu as déjà fait m'impressionne, même si quelques fois les résultats ne sont pas au rendez-vous, tu n'abandonnes pas ! Et tout ça avec le sourire (JP Foucault doit y être pour quelque chose...).

Stéphanie, continue à savoir ce que tu veux dans ta vie professionnelle et personnelle, c'est ça qui te fera tenir et que je trouve génial chez toi. Je te souhaite bonne chance pour accéder à tous tes rêves !

Alexandra, je te souhaite à toi aussi énormément de courage et de persévérance. Merci pour ta gentillesse et ton humour que j'adore ! Ne change pas !

Jean-Baptiste, merci d'avoir égayé nos pauses repas avec ta technique de coupage de banane... Tu es aussi une personne très courageuse, à l'image de Coralie, et la difficulté ne t'effraie pas, alors pour tous tes projets je te souhaite une belle réussite.

Je remercie également les membres de la plateforme.

Merci à Patrick Manas pour son aide concernant les xenogreffes chez les souris et pour son temps précieux.

Merci à Thibaut Andrieux et Sébastien Dussurgey pour leur aide et leurs conseils pour le tri des CSC par cytométrie de flux.

Merci à Aurélie et Nathalie qui ont toujours été là lorsque j'en avais besoin, mais aussi lors de nos pauses café. Merci les filles de votre générosité et de votre partage (bonnet, point de croix, etc), je vous souhaite à toutes les 2 beaucoup de bonheur !

Mes remerciements vont aussi à ma famille et mes amis qui, avec cette question récurrente, « Quand est-ce que tu la soutiens cette thèse ? », bien qu'angoissante en période fréquente de doutes, m'ont permis de ne jamais dévier de mon objectif final. Merci à Nany, Yves, Marie-Ange, Nathanaël, Marie-Noëlle, François, Majo, Romain, Julie, JC, Cloé, Pierrot, Nico, Perrine, Vincent, Emily, Rachou, Estelle, Amandine, Gaby et Chloé pour leur affection maintes fois renouvelée et pour leur présence le jour de ma soutenance. Merci à mon oncle Pierre et ma tante Brigitte, dont j'ai voulu suivre les traces pour voir l'effet que cela faisait... Merci à vous deux de votre présence inspirante et pour votre gentillesse qui ont contribué à ce que je suis devenue.

Enfin, je remercie mon époux Guillaume pour son soutien quotidien et pour continuer à me faire rire. Notre couple a grandi en même temps que mon projet scientifique, menant à la naissance de cette thèse mais aussi de notre petite Héloïse.

Ces remerciements ne peuvent s'achever sans une pensée pour ma mère, dont l'aide précieuse m'a permis de mettre un point final à ce projet. Sa présence et ses encouragements sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais.

Résumé

Les cancers des voies aéro-digestives supérieures (VADS) sont des cancers de mauvais pronostic avec 50% de rechute des patients dans les deux ans qui suivent leur traitement. La surexpression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 est un des marqueurs corrélés avec la résistance aux divers traitements. L'objectif de ce travail a été d'évaluer l'efficacité d'une approche thérapeutique associant l'irradiation à un inhibiteur des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X_L, l'ABT-737 (Laboratoires Abbott), ceci à la fois sur des lignées issues de cancers de VADS, mais également sur une sous-population de cellules souches cancéreuses (CSC).

La première partie de ce travail a démontré que cette association thérapeutique provoque une radio-sensibilisation des lignées cellulaires étudiées *in vitro*, avec augmentation de la mort cellulaire par apoptose. Cet effet synergique fait intervenir la mitochondrie, module le métabolisme des céramides et modifie l'expression de certaines protéines de la famille Bcl-2 dont l'équilibre est déterminant dans la destinée de la cellule cancéreuse. De plus, le traitement par l'ABT-737 permet de ralentir très sensiblement la croissance tumorale après irradiation sur un modèle *in vivo*.

La deuxième partie de ce travail a permis de révéler une efficacité cytotoxique encore plus importante de l'ABT-737 sur une sous-population de CSC, résistante à l'apoptose, proliférante et tumorigène, dont le rôle dans la résistance aux divers traitements fait l'objet de nombreux travaux. A cette efficacité cytotoxique s'ajoute une diminution de la migration et de l'invasion des CSC, effet très prometteur dans la lutte contre la récurrence locale et la dissémination métastatique, caractéristiques des cancers de VADS de haut grade.

Mots clé : Cancers des voies aéro-digestives supérieures, Bcl-2, Bcl-X_L, ABT-737, Irradiation, Cellules souches cancéreuses.

Summary

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) are frequently characterized by chemotherapy and radiation resistance and 5-year survival rates have lingered around 50% for several decades. The frequent resistance of HNSCC is due, in large part, to aberrant inhibition of apoptosis and overexpression of antiapoptotic members of the Bcl-2 protein family. The aim of this study was to examine, in association with radiation, the impact of ABT-737, a potent small-molecule inhibitor of Bcl-X_L and Bcl-2, on HNSCC cells and cancer stem cells (CSC).

The first part of our work demonstrated that ABT-737 strongly synergized with radiotherapy to promote HNSCC cell death and loss of clonogenic survival. This effect involves mitochondrial damage, modulates ceramide metabolism and modify the expression of some proteins of the Bcl-2 family whose interactions with other family members determine cell fate. Moreover, we found that this combination is able to significantly slow tumor growth.

The second part of our work revealed that ABT-737, even without radiation, had a preferential cytotoxic activity *in vitro* towards CSC. Thus, as CSC have a greater capacity for tumor relapse, increased motility and invasiveness, our data suggest that ABT-737 could effectively complement a first line of therapy with chemotherapy or radiotherapy in order to target residual quiescent HNSCC CSC.

Key words: Head and neck squamous cell carcinoma, Bcl-2, Bcl-X_L, ABT-737, Radiation, Cancer stem cells

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Sommaire

Liste des figures	17
Table des tableaux	20
Abréviations.....	21
Introduction générale	25
Rappels bibliographiques.....	29
Chapitre I - Les carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures	30
1. Généralités sur les cancers des voies aérodigestives supérieures	30
2. Biologie des carcinomes épidermoïdes des VADS	31
2.1. Modification de la signalisation induite par les facteurs de croissance	31
2.2. Modifications des autres voies de signalisation	33
3. Prise en charge des carcinomes épidermoïdes des VADS et biomarqueurs.....	35
3.1. Chirurgie.....	35
3.2. Radiothérapie	35
3.3. Chimiothérapie.....	37
3.4. Les thérapies ciblées	38
3.5. Les combinaisons de biomarqueurs.....	40
Chapitre II - Effets physiques des radiations ionisantes	42
1. Interactions des rayonnements ionisants avec la matière : cas des photons.....	42
1.1. L'effet photoélectrique	43
1.2. L'effet Compton.....	43
1.3. La production de paires.....	44
1.4. La diffusion de Thomson-Rayleigh	45
1.5. La réaction nucléaire.....	45
1.6. Prédominance de chaque effet physique.....	45
2. Interaction des rayonnements ionisants avec la matière : cas des hadrons	46
2.1. Les différents hadrons utilisés en radiothérapie	46
2.2. Effets physiques des hadrons	48
2.3. Atténuation des rayonnements dans le milieu.....	48
3. Effets physico-chimiques des radiations ionisantes.....	50
3.1. Effet physico-chimique direct.....	50
3.2. Effet physico-chimique indirect	50
Chapitre III - Effets biologiques des radiations ionisantes	52
1. Effets sur l'ADN et réparation.....	52

1.1.	Dommages à l'ADN radio-induits.....	52
1.2.	Systèmes de réparation des lésions à l'ADN radio-induites	54
2.	Autres cibles cellulaires.....	58
2.1.	Dommages oxydatifs des protéines	58
2.2.	Dommages oxydatifs des lipides.....	60
3.	Arrêts du cycle cellulaire radio-induits.....	61
3.1.	Généralités et régulation du cycle cellulaire	61
3.2.	Arrêts du cycle cellulaire après irradiation	63
4.	Mort cellulaire radio-induite	65
4.1.	Mort cellulaire immédiate.....	65
4.2.	Nécrose	65
4.3.	Autophagie	65
4.4.	Sénescence	66
4.5.	Mort mitotique	66
4.6.	Apoptose	67
5.	Effets cellulaires des rayonnements ionisants.....	71
5.1.	Survie cellulaire.....	71
5.2.	Efficacité biologique relative	72
Chapitre IV - La famille Bcl-2		74
1.	Classification des protéines de la famille Bcl-2.....	74
1.1.	Les protéines anti-apoptotiques.....	75
1.2.	Les protéines pro-apoptotiques multi-domaines	87
1.3.	Les protéines pro-apoptotiques BH3-only.....	91
2.	Implication des protéines de la famille Bcl-2 dans la perméabilisation de la MEM	101
2.1.	Modèle d'activation directe	101
2.2.	Modèle d'activation indirecte.....	102
2.3.	Modèle commun.....	103
3.	Les inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques	103
3.1.	Rôle des protéines de la famille Bcl-2 dans le développement et le maintien des cancers ...	103
3.2.	Différents inhibiteurs	105
Chapitre V – Les cellules souches cancéreuses		115
1.	Les cellules souches cancéreuses.....	115
1.1.	Les cellules souches normales	115
1.2.	La théorie des cellules souches cancéreuses.....	118
1.3.	La transition épithélio-mésenchymateuse	120
1.4.	Les principales voies de signalisation spécifiques des CSC.....	122
2.	Biomarqueurs des CSC dans les cancers des VADS	125
2.1.	Isolement de la <i>Side Population</i>	125
2.2.	Les marqueurs de surface	126

2.3.	L'Aldéhyde Déshydrogénase	127
3.	Les origines potentielles de résistance des CSC aux traitements.....	127
3.1.	L'efflux des agents chimio-thérapeutiques	128
3.2.	La réparation des dommages à l'ADN	128
3.3.	La résistance à l'apoptose	128
3.4.	La résistance aux espèces réactives de l'oxygène.....	129
3.5.	L'hypoxie	129
3.6.	La quiescence	129
3.7.	L'auto-renouvellement.....	129
Objectifs.....		130
Matériels et Méthodes.....		134
1.	Lignées cellulaires et traitements	135
1.1.	Lignées cellulaires et conditions de culture.....	135
1.2.	Tri des cellules souches cancéreuses et mise en culture.....	135
1.2.1.	Exclusion du Hoechst	135
1.2.2.	Marquage du récepteur CD44	137
1.2.3.	Double marquage des cellules : ALDH et CD44.....	138
1.2.4.	Culture des CSC.....	140
1.2.5.	Culture en tumorisphères	140
1.3.	Traitements pharmacologiques.....	140
1.4.	Etude de la combinaison du Cisplatine et de l'ABT-737	141
1.4.1.	Méthode isobolographique.....	141
1.4.2.	Méthode du calcul du « Combination Index ».....	143
1.5.	Irradiation photonique.....	143
1.6.	Etude de la combinaison de l'ABT-737 et de l'irradiation	143
2.	Transfection par un siRNA dirigé contre Noxa	144
3.	Etude de la mort cellulaire	144
3.1.	Test de toxicité au cristal violet	144
3.2.	Survies clonogéniques.....	145
3.3.	Analyse du cycle cellulaire.....	145
3.4.	Méthode TUNEL.....	146
3.5.	Test des caspases activées	147
4.	Etude des cassures doubles brins de l'ADN	148
4.1.	Visualisation des foci 53BP1	148
4.2.	Test des comètes en conditions neutres.....	148
5.	Etude des altérations mitochondriales	150

5.1.	Mesure du potentiel de membrane mitochondrial	150
5.2.	Délétion de l'ADN mitochondrial	150
5.2.1.	Préparation du lysat cellulaire	150
5.2.2.	Amplification de l'ADN par PCRq	151
6.	Etude de l'équilibre redox.....	152
6.1.	Mesure du glutathion intracellulaire par HPLC.....	152
6.2.	Mesure de la production d'espèces réactives de l'oxygène	153
6.3.	Mesure de la production des ERO intra-mitochondriaux.....	153
6.3.1.	Mesure par microscopie.....	153
6.3.2.	Mesure par cytométrie de flux	154
7.	Analyse protéique par Western blot.....	154
7.1.	Préparation et purification de mitochondries isolées.....	154
7.2.	Préparation des échantillons pour les Western blots	155
7.3.	Electrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) et transfert sur membrane de nitrocellulose 156	
7.4.	Marquage et révélation des protéines par chimiluminescence.....	158
8.	Etude de la migration et de l'invasion cellulaire	158
9.	Exploration du métabolisme des céramides	160
9.1.	Extraction des sphingolipides	160
9.1.1.	Réactifs.....	160
9.1.2.	Traitement des échantillons	161
9.2.	Analyse en HPLC- MS/MS.....	162
9.2.1.	Mise en tube d'injection.....	162
9.2.2.	Analyse des échantillons	162
10.	Etude in vivo	162
10.1.	Xénogreffes	162
10.2.	Traitements et irradiation des souris	163
10.3.	Suivi de l'évolution tumorale.....	164
10.4.	Considérations éthiques.....	165
11.	Analyses statistiques	165
Résultats et Discussion.....		166
Partie 1 : Etude de l'inhibition des protéines Bcl-2 et Bcl-X_L en combinaison avec l'irradiation .167		
1.	Relation entre l'expression des protéines de la famille Bcl-2 et la réponse à l'ABT-737 de différentes lignées cellulaires.....	167
2.	Effet de l'irradiation combinée à l'inhibition des protéines Bcl-2 et Bcl-X _L	170
3.	L'ABT-737 a une action synergique avec l'irradiation	172

4.	Etude de l'activation de l'apoptose en réponse au traitement combiné	173
5.	Le traitement à l'ABT-737 induit une translocation de la protéine Bax à la mitochondrie	175
6.	Mécanisme impliqué lors de l'inhibition des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.....	177
6.1.	Le traitement à l'ABT-737 n'augmente pas les dommages à l'ADN après irradiation	177
6.2.	Le traitement à l'ABT-737 augmente le stress oxydant intra-mitochondrial.....	179
6.3.	Effet du traitement combiné sur la production de céramide	185
6.4.	Modification de l'expression des protéines de la famille Bcl-2 après traitement et/ou irradiation	192
6.5.	Transfection par un siRNA anti-Noxa	196
7.	Effet de l'ABT-737 combiné à l'irradiation sur la croissance tumorale <i>in vivo</i>	197
 Partie 2. Etude d'une sous-population de cellules souches cancéreuses issue de la lignée SQ20B		
200		
1.	Etude de différents marqueurs de cellules souches cancéreuses.....	200
1.1.	Comparaison de deux populations ayant des marqueurs souches différents	200
1.2.	Etude de différents milieux de culture sur l'expression des marqueurs ALDH et CD44.....	202
1.3.	Etude de la culture en tumorisphères sur l'expression de l'ALDH et du CD44	204
2.	Etude de l'effet de l'ABT-737 combiné à l'irradiation sur une sous-population de CSC.....	207
2.1.	Expression basale des différentes protéines de la famille Bcl-2 dans les CSC	207
2.2.	L'inhibition par l'ABT-737 des protéines Bcl-2 et Bcl-X _L entraîne une augmentation importante de la mort par apoptose dans les CSC	208
2.3.	Modification de l'expression des protéines de la famille Bcl-2 après traitement par l'ABT-737	211
2.4.	Transfection des CSC par un siRNA anti-Noxa	213
2.5.	Le traitement par l'ABT-737 permet de diminuer la migration et l'invasion des CSC	215
 Partie 3. Etude préliminaire de l'effet de l'ABT-737 associé au traitement conventionnel		
combinant le cisplatine et l'irradiation.218		
1.	Etude isobologique des traitements par l'ABT-737 et le cisplatine	218
2.	Etude de la mort cellulaire par apoptose	221
3.	Etude <i>in vivo</i>	223
Conclusion.....		226
Références bibliographiques.....		232
Annexes		282
Communications orales et affichées		283
Publications		284

Liste des figures

Figure 1 : Les différentes voies de signalisation de l'EGFR.	31
Figure 2 : Les différentes voies de signalisation du TGF- β	33
Figure 3 : L'effet photoélectrique.	43
Figure 4 : L'effet Compton.	44
Figure 5 : La production de paires.	44
Figure 6 : Prédominance des effets physiques.	46
Figure 7 : La diffusion en profondeur d'un faisceau est plus élevée dans le cas des protons que dans le cas des ions carbone.	47
Figure 8 : Comparaison des dépôts de doses pour des photons, des électrons et des ions carbone.	49
Figure 9 : Courbes de rendement en profondeur des photons, des protons et des ions carbone.	50
Figure 10 : Radiolyse de l'eau.	51
Figure 11 : Réparation des mésappariements de bases.	54
Figure 12 : Réparation par excision de base.	55
Figure 13 : Réparation par excision de nucléotide.	56
Figure 14 : Réparation des CDB.	58
Figure 15 : Les étapes de la peroxydation lipidique.	60
Figure 16 : Schéma simplifié du cycle cellulaire et de sa régulation.	62
Figure 17 : Différentes étapes de l'apoptose.	69
Figure 18 : Métabolisme du céramide	70
Figure 19 : Exemples de courbes de survie de deux lignées cellulaires.	71
Figure 20 : Exemple de calcul d'EBR pour une même lignée sur deux faisceaux différents.	73
Figure 21 : Schéma simplifié de l'action des protéines anti-apoptotiques et proapoptotiques de la famille Bcl-2 lors de l'apoptose	74
Figure 22 : Structure des protéines de la famille Bcl-2.	75
Figure 23 : Rôle de Bik dans l'entrée en apoptose.	99
Figure 24 : Modèles d'activation de l'apoptose.	101
Figure 25 : Rôle des espèces réactives de l'oxygène dans oncogénèse	104
Figure 26 : Structure chimique de composés de la famille des BH3-mimétiques.	108

Figure 27 : Action de l'ABT-737 et de Noxa dans les cellules cancéreuses résistantes à l'ABT-737	111
Figure 28 : Stades de l'embryogénèse et le type de cellules souches associées.	116
Figure 29 : Différentes divisions cellulaires d'une cellule souche.....	116
Figure 30 : Représentation des modèles de la transformation tumorale.....	119
Figure 31 : Processus métastatique	121
Figure 32 : Tri de la SP après marquage au Hoechst 33342.....	136
Figure 33 : Marquage du CD44 à partir de cellules SP.	137
Figure 34 : Double marquage CD44 et ALDH.	139
Figure 35 : Graphique permettant de déterminer l'effet de la combinaison de deux molécules.	142
Figure 36 : Distribution de cellules dans le cycle cellulaire par coloration au DAPI et analyse par cytométrie en flux.	146
Figure 37 : Purification des mitochondries.....	155
Figure 38 : Principe de la mesure de la migration et de l'invasion grâce au xCELLigence...	158
Figure 39 : Diagramme de randomisation.	163
Figure 40 : Etude de la corrélation entre la sensibilité à l'ABT-737 et différents paramètres concernant les lignées issues des VADS.	169
Figure 41 : Etude du pourcentage de cellules en phase sub-G1 sur 4 lignées cellulaires issues de carcinomes épidermoïdes des VADS.....	171
Figure 42 : Survies clonogéniques de la lignée cellulaire SQ20B.	172
Figure 43 : Etude de l'entrée en apoptose des cellules SQ20B comme conséquence du traitement combiné ABT-737 / irradiation à 10 Gy.	174
Figure 44 : Translocation de Bax à la mitochondrie.	176
Figure 45 : Etude des dommages à l'ADN.	178
Figure 46 : Etude des altérations mitochondriales.....	180
Figure 47 : Etude du stress oxydant précoce mitochondrial après traitement par l'ABT-737.	182
Figure 48 : Exemple de spectres obtenu lors de la séparation des céramides par HPLC-MS/MS.	186
Figure 49 : Différents types de céramides présents dans les SQ20B témoin.....	187
Figure 50 : Evolution de la quantité des espèces saturées de céramide lors des traitements de la lignée SQ20B.	188

Figure 51 : Evolution de la quantité des espèces insaturées de céramide lors des traitements de la lignée SQ20B.	189
Figure 52 : Evolution de la quantité des espèces hydroxylées de céramide lors des traitements de la lignée SQ20B.	190
Figure 53 : Expression des protéines de la famille Bcl-2 24 heures après traitement et/ou irradiation dans les SQ20B.	193
Figure 54 : Effet de l'extinction de Noxa dans les cellules SQ20B avant traitement par l'ABT-737 et/ou irradiation.	196
Figure 55 : Croissance tumorale des xénogreffes de SQ20B chez la souris.....	198
Figure 56 : Marquage des cellules ALDH ^{high} /CD44 ^{high} et ALDH ^{low} /CD44 ^{high}	201
Figure 57 : Formation de tumorisphères.....	202
Figure 58 : Evolution de l'expression des marqueurs CD44 et ALDH dans les cellules ALDH ^{high} /CD44 ^{high} lors de la culture dans deux milieux différents.	204
Figure 59 : Evolution de l'expression du marqueur CD44 dans les cellules ALDH ^{low} /CD44 ^{high} lors de la culture dans deux milieux différents.	204
Figure 60 : Expression des protéines de la famille Bcl-2 dans la sous-population CD44 ^{high}	207
Figure 61 : Effet du traitement par l'ABT-737 sur la mort des CSC.	209
Figure 62 : Modification de l'expression des protéines de la famille Bcl-2 après traitement et/ou irradiation de CSC.	211
Figure 63 : Effet de l'extinction de Noxa dans les CSC avant traitement par l'ABT-737 et/ou irradiation.	214
Figure 64 : Migration et invasion des CSC.....	216
Figure 65 : Etude de la combinaison entre le Cisplatine et l'ABT-737 sur la lignée SQ20B.....	219
Figure 66 : Etude de la mort cellulaire par apoptose après différents traitements de la lignée SQ20B.....	222
Figure 67 : Etude de la croissance tumorale après xenogreffe de cellules SQ20B et traitement.	223
Figure 68 : Schéma de la modulation de l'expression des protéines de la famille Bcl-2 lors des différentes conditions de traitement.	228
Figure 69 : Interactome entre les protéines de la famille Bcl-2	229

Table des tableaux

Tableau 1 : Résumé des résultats des études cliniques concernant le Nimotuzumab (Nimo) et le Panitumumab (Pani)	39
Tableau 2 : Principaux produits d'oxydation de quelques acides aminés.	59
Tableau 3 : Les différents complexes cycline/CDK présents selon la phase du cycle cellulaire.	63
Tableau 4 : Interactions des protéines anti-apoptotiques avec les protéines pro-apoptotiques effectrices	82
Tableau 5 : Interactions des protéines anti-apoptotiques avec les protéines BH3-only	82
Tableau 6 : Association de l'ABT-737 avec d'autres types de traitements chimiothérapeutiques ou radiothérapeutiques.	110
Tableau 7 : Séquence de primers pour la PCRq.....	151
Tableau 8 : Informations et paramètres d'utilisation des anticorps primaires lors des Western blots.	157
Tableau 9 : Informations et paramètres d'utilisation des anticorps secondaires lors des Western blots.	158
Tableau 10 : Solutions mères d'étalons internes.	160
Tableau 11 : Caractéristiques des différentes lignées cellulaires étudiées.	168
Tableau 12 : Etude isobolographique des survies clonogéniques.	173
Tableau 13 : Expression des protéines de la famille Bcl-2 normalisé par l'expression de l' α -tubuline par rapport au control.	193
Tableau 14 : Culture des cellules ALDH ^{high} /CD44 ^{high} en tumorisphères après 1 passage en conditions classiques.	205
Tableau 15 : Culture des cellules ALDH ^{low} /CD44 ^{high} en tumorisphères après 1 passage en conditions classiques.	206
Tableau 16 : Expression des protéines de la famille Bcl-2 normalisé par l'expression de l' α -tubuline dans les cellules CD44 ^{high} par rapport à leur expression dans les cellules SQ20B. .	207
Tableau 17 : Expression des protéines de la famille Bcl-2 normalisé par l'expression de l' α -tubuline par rapport au control.	211
Tableau 18 : Calcul des « Combination Index » pour chaque condition.	220

Abréviations

5FU : Fluorouracile	CDK : Cycline-Dependant Kinase
ABC : <i>ATP-Binding Cassette</i>	Cer : Céramide
ABCG2 : <i>ATP-Binding Cassette type G2</i>	CerS : Céramide Synthase
ADNmt : ADN mitochondrial	CI : <i>Combination Index</i>
ALDH : Aldéhyde Déshydrogénase	CKI : Inhibiteurs de CDK (<i>CDK inhibitors</i>)
AMPK : <i>Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase</i>	CoA : Coenzyme A
AP endonucléase : Apurique/apyrimidique endonucléase	COX : Cytochrome c Oxidase
APC : Allophycocyanine	CS : Cellules Souches
ARNm : ARN messenger	CSC : Cellules Souches Cancéreuses
ATM : <i>Ataxia Telangectasia Mutated</i>	CT : Chimiothérapie
ATR : <i>Ataxia Telangectasia mutated and Rad3 related</i>	DEAB : Diéthylaminobenzaldéhyde
ATRA : <i>All-Trans Retinoic Acid</i>	DHE : Dihydroéthidium
Bad : <i>Bcl2-associated agonist of cell death</i>	Dhh : <i>Desert Hedgehog</i>
Bcl-2 : <i>B Cell Lymphoma-2</i>	DIC : <i>Dicarboxylate Carrier</i>
BER : Réparation par excision de base (<i>Base Excision Repair</i>)	Dll : <i>Delta-like ligand</i>
Bfl-1 : <i>Bcl-2 related gene expressed in fetal liver</i>	DMSO : Diméthylsulfoxyde
BH : Bcl-2 homology domain	DNA-PK : <i>DNA-dependent protein kinase</i>
Bid : <i>BH3 interacting domain death agonist</i>	DRP1 : <i>Dynamin related protein 1</i>
Bim : <i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i>	EGF : <i>Epidermal Growth Factor</i>
Bik : <i>Bcl-2-interacting killer</i>	EGFR : <i>Epidermal growth factor receptor</i>
Bmf : <i>Bcl-2-modifying factor</i>	EN : Enveloppe Nucléaire
BSA : <i>Bovine Serum Albumin</i>	ERK : <i>Extracellular signal-Regulated protein Kinases</i>
CAIX : <i>Carbonic Anhydrase type IX</i>	ERO : Espèces réactives de l'oxygène
	FGF : Fibroblast Growth Factor
	FITC : Isothiocyanate de fluorescéine (<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>)
	Fpg : Formamidopyrimidine-DNA Glycosylase

FSC : *Forward Scatter*
 Fz : *Frizzled*
 Grp75 : *Glucose Regulating Protein 75*
 GSK-3 : *Glycogen synthase kinase-3*
 HBSS : *Hank's Balanced Salt Solution*
 HIF : *Hypoxia Inducible Factors*
 HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance (*High-Performance Liquid Chromatography*)
 HPV : Papillomavirus humain (*Human papillomavirus*)
 HRP : Peroxydase de raifort
 IDP : Protéines intrinsèquement non structurées (*Intrinsically Disordered Proteins*)
 IHC : Immunohistochimie
 Ihh : *Indian Hedgehog*
 IIP : Injection intrapéritonéale
 IP : Iodure de Propidium
 IP3R : Récepteur à l'inositol-1,4,5-triphosphate (*inositol-1,4,5-triphosphate receptor*)
 Jag : *Jagged*
 JNK : *c-Jun NH(2)-terminal kinase*
 LDLR : *Low Density Lipoprotein Receptor*
 LMPA: *Low Melting Point Agarose*
 MAM : Membranes associées aux mitochondries (*Mitochondria Associated Membranes*)
 MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinases*
 MDR1 : *Multidrug Resistance Transporter 1*
 MEC : Matrice ExtraCellulaire

MEM : Membrane Externe Mitochondriale
 miARN : microARN
 MMR : Réparation des mésappariements (*MisMatch Repair*)
 MULE : *Mcl-1 Ubiquitin Ligase E3*
 NER : Réparation par excision de nucléotide (*Nucleotide Excision Repair*)
 NER-CT : NER couplée à la transcription
 NER-GG : NER génomique globale
 NHEJ : Recombinaison non-homologue (*Non-Homologous End Joining*)
 NICD : *Notch IntraCellular Domain*
 OGC : *2-Oxoglutarate Carrier*
 Ptch: *Patched*
 PBS : Tampon phosphate salin (*Phosphate Buffered Saline*)
 PCNA : *Proliferating cell nuclear antigen*
 PCR : *Polymerase Chain Repeat*
 PE : *Plating Efficiency*
 PFA : Paraformaldéhyde
 PKA : Protéine kinase A
 PMAIP1 : *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*
 PPA2 : *Protein Phosphatase 2*
 PUMA : *p53 upregulated modulator of apoptosis*
 RCMI : Radiothérapie Conformationnelle avec Modulation d'Intensité
 RE : Réticulum Endoplasmique
 Shh : *Sonic Hedgehog*
 siRNA : *small interfering RNA*
 SM : Sphingomyéline
 SMases : Sphingomyélinase
 Smo : *Smoothed*

SP : *Side Population*
 SPT : *Sérine Palmitoyl Transférase*
 STAT-3 : *Signal Transducer and Activator of Transcription-3*
 TACE : *TNF- α -Converting Enzyme*
 TBS : *Tris-buffered saline*
 TEL : *Transfert d'Energie Linéique*
 TEM: *Transition Epithélio-mésenchymateuse*
 TGF- β : *Transforming Growth Factor- β*
 TME: *Transition Mésoenchymo-Epithéliale*
 TUNEL : *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*
 USP9X : *Ubiquitin Specific Peptidase 9 X-linked*
 UV : *Ultra-Violet*
 VADS : *Voies aéro-digestives supérieures*
 VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*
 VDAC : *Voltage Dependent-Anion-Channel*
 VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*
 XIAP : *X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*

Introduction générale

Les cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS) arrivent au 6^{ème} rang par ordre de fréquence et représentent environ 6% de l'ensemble des cancers avec 600 000 nouveaux cas par an. Ces cancers des VADS, qui regroupent l'ensemble des cancers de la cavité buccale, de l'oropharynx, de l'hypopharynx et des sinus de la face, constituent un enjeu majeur de santé publique car ils représentent 10% de l'ensemble des cancers en France dont la presque totalité est attribuable au tabac, à l'alcool et à l'infection par l'HPV (*Human Papilloma Virus*). Leur symptomatologie souvent tardive et le statut social défavorable des patients expliquent que 60% d'entre eux ne sont diagnostiqués qu'à un stade avancé (III ou IV) ; le taux de survie à 5 ans ne dépasse pas 50% durant lesquels la qualité de vie des patients traités est particulièrement dégradée (Carvalho *et al.*, 2005). Ces taux de survie médiocres n'ont pas beaucoup évolué au cours des 3 dernières décennies en dépit d'avancées technologiques et biologiques innovantes : chimiothérapie d'induction avant chirurgie, chimiothérapie adjuvante ou concomitante avec la radiothérapie (radiothérapie fractionnée, radiothérapie conformationnelle par modulation d'intensité, tomothérapie...) et plus récemment les thérapies ciblées contre les récepteurs de l'EGF (Cetuximab...), les récepteurs à tyrosine kinases (Erlotinib...), au VEGF (Vandetanib...)... Le Cetuximab a été validé par la *Food and Drug Administration* en 2006 et un essai clinique de phase III a montré une modeste amélioration de la survie (+9 %) (Bonner *et al.*, 2010). Pour ces cancers de mauvais pronostic, les récurrences locales représentent la principale cause d'échec thérapeutique (60%), devant l'évolution métastatique (30%) et la survenue de nouveaux cancers primitifs (Vokes *et al.*, 1993). Elles surviennent dans 90% des cas dans les 2 ans qui suivent le traitement et soulignent la radio-(chimio)-résistance de ces tumeurs. La validation de protocoles thérapeutiques résultant de nouvelles associations demeure donc un challenge permanent car nous ne disposons toujours pas d'un traitement de choix mais plutôt de choix de traitements.

Cette résistance est, pour sa plus grande part, liée à une inhibition aberrante de la mort apoptotique des cellules tumorales. Un grand nombre de protéines ou de voies de signalisation qui contribuent à la prolifération tumorale par blocage de l'apoptose sont en effet surexprimées ou hyper-activées dans les cancers des VADS. Parmi celles-ci, on trouve **les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2** (Li *et al.*, 2008), protéines qui inhibent l'apoptose chimio- et/ou radio-induite en contrôlant la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe au cours du déclenchement de la voie intrinsèque de l'apoptose. En dehors du blocage mitochondrial, les protéines de la famille Bcl-2 peuvent également bloquer l'apoptose *via* d'autres mécanismes tels que l'inhibition du relargage du calcium intracellulaire, le contrôle

des mécanismes de défense contre le stress oxydant... L'inhibition des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 demeure donc une stratégie prometteuse dont le potentiel, en association avec la radiothérapie, n'a pas encore été exploré dans les cancers des VADS.

Après que des oligonucléotides anti-sens et divers peptido-mimétiques aient été testés, une nouvelle famille de molécules BH3-mimétiques a été mise au point par les laboratoires Abbott. Ces molécules sont capables de s'associer et d'inhiber des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, telles que Bcl-2, Bcl-X_L et Bcl-W, avec une affinité 100 à 10 000 fois supérieure à celle des autres molécules utilisées jusqu'à présent. L'utilisation de l'ABT-737 *in vitro* et au cours d'essais précliniques a donné des résultats prometteurs, seul ou en association avec d'autres molécules chimio-thérapeutiques, principalement dans les cancers lymphoïdes et les cancers pulmonaires à petites cellules. En ce qui concerne les cancers des VADS, nous ne disposons que de trois études *in vitro* qui ont montré que l'ABT-737 est efficace en association avec le cisplatine et l'étoposide (Li *et al.*, 2009), avec la Meayamicin B (Gao *et al.*, 2014) ou un siRNA anti-Mcl-1 (He *et al.*, 2013). Aucune étude n'a jusqu'à présent été entreprise sur l'utilisation de molécules BH3-mimétiques associées à la radiothérapie dans ce type de cancers.

L'objectif de ce travail a donc été d'étudier, dans une première partie, le potentiel thérapeutique d'une association combinant un BH3-mimétique, l'ABT-737, à une irradiation photonique dans des lignées de radiosensibilité graduelle issues de cancers des VADS et à caractériser à l'échelle subcellulaire l'effet de cette association en prenant pour référence la lignée cellulaire la plus résistante de notre panel. La forte récurrence et le pouvoir invasif des cancers des VADS de haut grade étant en grande partie imputé à l'existence de cellules souches cancéreuses (CSC) au sein des tumeurs primitives, cellules contre lesquelles aucun protocole n'a encore été validé, notre association thérapeutique a été testée, dans une deuxième partie, sur une sous-population de CSC isolée et enrichie à partir de la lignée parentale la plus résistante.

L'ensemble de nos résultats démontre le fort potentiel de cette association thérapeutique *in vitro* mais également *in vivo*. De façon inattendue, cette combinaison thérapeutique s'est révélée comme étant encore plus efficace sur les cellules souches cancéreuses ce qui souligne sa pertinence pour de futures études cliniques.

Rappels bibliographiques

Chapitre I - Les carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures

Les carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures sont des cancers très hétérogènes à la fois d'un point de vue histologique et de par leur profil ADN et ARN. Ces différences de profil constituent des données précieuses utilisables pour améliorer le pronostic des patients, adapter leur traitement et au niveau biologique, identifier les gènes responsables du développement de ces cancers.

1. Généralités sur les cancers des voies aérodigestives supérieures

Les cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS) regroupent l'ensemble des cancers de la bouche (lèvre, langue mobile, plancher de la bouche), du pharynx (cavum, voile du palais, amygdales, base de la langue, sinus piriforme), du larynx (épiglote, corde vocale), et des sinus de la face (fosses nasales et sinus).

Chaque année en France, environ 20 000 nouveaux cas de cancer des VADS sont diagnostiqués, très majoritairement chez les hommes. Dans plus de 95% des cas, ces cancers sont des carcinomes épidermoïdes, c'est-à-dire des cancers développés au niveau de la muqueuse qui tapisse ces organes. Les autres types de cancers (adénocarcinomes, carcinomes adénoïdes kystiques, lymphomes malins ou sarcomes) sont plus rares.

Les deux facteurs de risque principaux sont le tabac et l'alcool, l'association des deux ayant un effet de potentialisation. La fumée de tabac agit sur les muqueuses aérodigestives supérieures de par les nombreux cancérogènes qu'elle contient et l'alcool facilite leur dissolution, leur pénétration et leur diffusion dans la muqueuse. De plus, l'âge moyen de survenue des cancers des VADS est de 55 ans, mais la fréquence du tabagisme dès l'adolescence explique qu'aujourd'hui plus de 25% des cas soient diagnostiqués avant 50 ans. Un sous-groupe de cancer des VADS, particulièrement ceux de l'oropharynx, peut résulter d'une infection par le papillomavirus humain (HPV). Le diagnostic est le plus souvent établi après un long délai d'évolution et les tumeurs sont plus souvent classées T3 (tumeur de plus de 3 cm) ou T4 (tumeur envahissant les structures adjacentes). Les VADS intervenant dans la

déglutition, la phonation et la respiration, les principaux signes cliniques associés à ces cancers sont donc en rapport avec ces fonctions, à savoir une dysphagie, une dysphonie ou une dyspnée.

2. Biologie des carcinomes épidermoïdes des VADS

La carcinogénèse des cellules épithéliales menant à la formation de tumeurs des VADS se fait par un processus évolutif débutant par des altérations moléculaires dont les accumulations permettent la transformation cancéreuse.

2.1. Modification de la signalisation induite par les facteurs de croissance

2.1.1. La voie de l'EGFR

L'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) est un récepteur transmembranaire de la famille ErbB qui interagit avec les ligands EGF et TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*). L'activation de l'EGFR par ces ligands induit son homo-dimérisation et sa phosphorylation, ce qui provoque l'activation de nombreuses cascades de signalisation telles que les voies **PI3K-AKT**, **Ras-MAP kinases**, **STAT** ou encore la voie de la **phospholipase C**. Ces cascades d'activation sont impliquées dans la régulation de la survie, de l'invasion/migration, de l'angiogenèse et dans diverses résistances aux agents chimio-thérapeutiques et aux rayonnements ionisants (Figure 1).

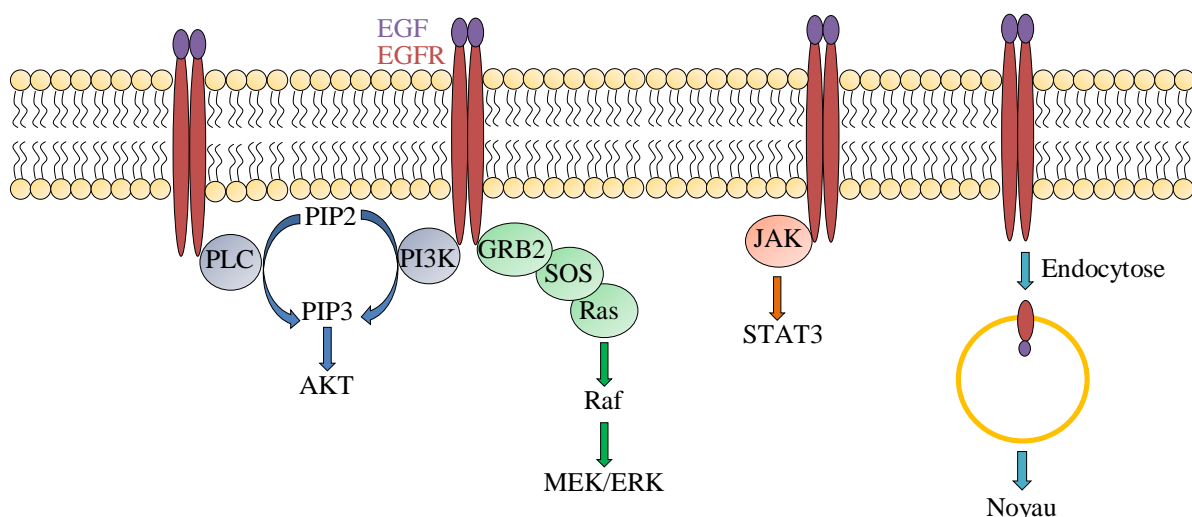


Figure 1 : Les différentes voies de signalisation de l'EGFR.

Parallèlement à l'activation de ces voies de signalisation, l'EGFR exerce également un rôle direct sur le noyau. En effet, lorsqu'il est activé, l'EGFR peut être internalisé par endocytose puis acheminé vers le noyau *via* l'appareil de Golgi. Une fois dans le noyau, il peut activer directement la transcription de gènes impliqués dans la prolifération et la survie (Brand *et al.*, 2011) ou dans la réplication et la réparation de l'ADN (Wang *et al.*, 2006 ; Dittmann *et al.*, 2005).

Dans les carcinomes épidermoïdes des VADS, l'EGFR est souvent surexprimé, cette surexpression étant corrélée à une diminution de la survie des patients ainsi qu'une augmentation de la récurrence locorégionale (Ang *et al.*, 2004). De plus, l'EGFR peut présenter des mutations, le mutant EGFRvIII (Sok *et al.*, 2006) étant le plus fréquent (42% des cas) avec pour conséquence une augmentation de la prolifération cellulaire (Sok *et al.*, 2006). Enfin, la localisation nucléaire de l'EGFR est corrélée à un faible taux de survie du patient 5 ans après traitement et à une augmentation du taux de récurrence (Lo *et al.*, 2005 ; Psyrri *et al.*, 2005).

2.1.2. La voie du TGF- β

La voie du TGF- β est la deuxième voie de signalisation importante associée aux carcinomes épidermoïdes des VADS. Les protéines de la famille TGF- β sont des molécules de signalisation cellulaire impliquées dans de nombreux processus biologiques fondamentaux, tels que la prolifération, la différenciation ou l'invasion/migration. Quand le TGF- β se lie aux récepteurs TGF- β de type I (T β R-I) ou TGF- β de type II (T β R-II), ceux-ci se dimérisent et activent les voies de signalisation SMAD-dépendantes et SMAD-indépendantes. Dans la voie SMAD-dépendante, les protéines SMAD2 et SMAD3 sont recrutées puis phosphorylées et forment un complexe avec SMAD4. Ce complexe va s'accumuler dans le noyau et activer la transcription de certains gènes impliqués dans la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire. Parallèlement, T β R-I et T β R-II peuvent activer d'autres voies de signalisation comme les voies PI3K – AKT, Ras – Erk – MAPK, p38 – MAPK (Figure 2)...

Les carcinomes épidermoïdes des VADS sont souvent résistants au TGF- β ce qui conduit à un échappement tumoral et à une modification de la prolifération cellulaire. Dans la majorité des cas, il y a sous expression du récepteur TGF- β II. De plus, des mutations délétères ont été détectées au niveau des gènes T β R-I (Chen *et al.*, 2001), T β R-II (Wang *et al.*, 1997), SMAD2 et SMAD4 (Qiu *et al.*, 2007). Une hyperméthylation des promoteurs de T β R-I a

également été rapportée (Muñoz-Antonia *et al.*, 2009), ce qui inactive sa transcription et induit une sous expression de SMAD4 (Bornstein *et al.*, 2009).

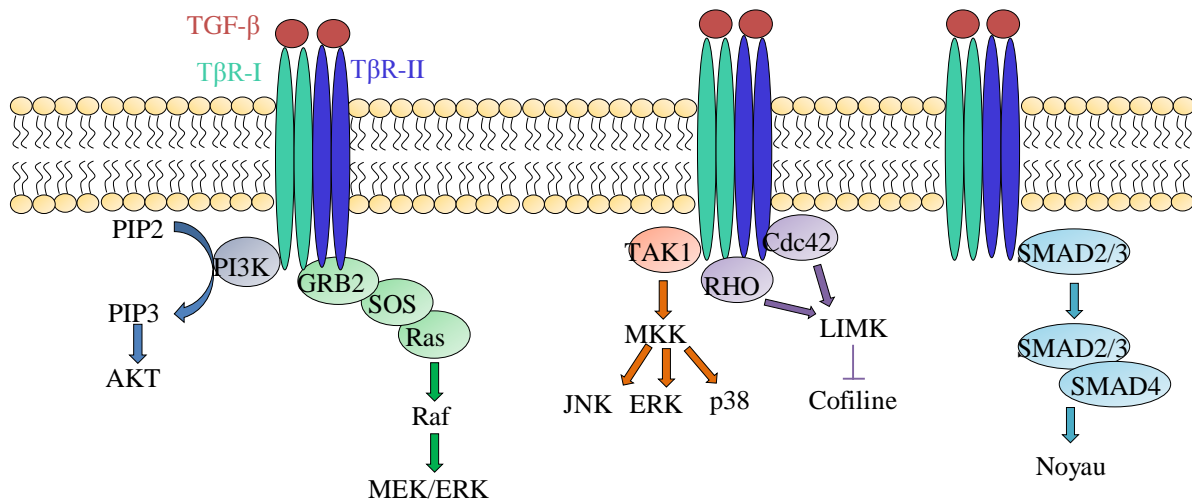


Figure 2 : Les différentes voies de signalisation du TGF-β.

2.2.Modifications des autres voies de signalisation

2.2.1. Potentiel réplcatif infini : les voies p53 et Rb

La modification de la régulation du cycle cellulaire est une des principales fonctions cellulaires aboutissant à une réplication illimitée des cellules cancéreuses. La protéine p53 est une protéine clé dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose. Dans les carcinomes épidermoïdes des VADS, son gène, *TP53*, peut être inactivé soit par l'oncogène E6 dans le cas des tumeurs HPV positives, soit par mutation chez 50% des patients HPV négatifs (Poeta *et al.*, 2007). De plus, la présence d'une mutation du gène *TP53* est corrélée à une diminution de la survie des patients 5 ans après leur traitement, leur réponse à la radiothérapie étant encore plus faible lorsque la mutation est localisée dans les régions de liaison à l'ADN (Poeta *et al.*, 2007 ; Peltonen *et al.*, 2011).

La voie p16^{INK4A}-cycline D1-CDK4/6 - Rb est également une voie de signalisation fondamentale dans la régulation du cycle cellulaire. Le gène *CDKN2A*, qui code pour la protéine p16^{INK4A}, peut être inactivé par mutation ou par méthylation, cette inactivation étant combinée avec une perte de chromosome ou une délétion homozygote, ceci dans plus de 80% des carcinomes épidermoïdes des VADS (Reed *et al.*, 1996 ; Ohta *et al.*, 2009). De plus, le gène *CCND1*, qui code pour la cycline D1, peut être amplifié ou gagné dans plus de 80% des cas de

carcinomes épidermoïdes HPV négatifs (Smeets *et al.*, 2006), la protéine étant surexprimée chez près de 40% des patients atteints de carcinomes épidermoïdes des VADS (Huang *et al.*, 2012). Conjugués à la suppression de p53, ces changements provoquent alors l'immortalisation des cellules.

2.2.2. La voie PI3K-PTEN-AKT

La voie PI3K-AKT est également modifiée dans les carcinomes épidermoïdes des VADS. La famille des PI3Ks est composée de trois classes d'enzymes dont le rôle est de phosphoryler les groupements 3-OH du phosphatidylinositol (PI). Cette famille de protéines est la plus fréquemment mutée (30,5% des cas) dans les carcinomes épidermoïdes des VADS et plus particulièrement chez des patients HPV négatifs dont les tumeurs sont à un stade avancé (Lui *et al.*, 2013). Ces mutations provoquent généralement une augmentation de la prolifération cellulaire, ainsi qu'une instabilité génomique.

Les mutations les plus souvent observées concernent plus particulièrement le gène *PIK3CA* qui code pour la sous-unité catalytique d'une PI3K. En effet, 12,6% des patients atteints d'un carcinome épidermoïde des VADS présentent une mutation de ce gène et il est sur-exprimé dans 24% des cas (Lui *et al.*, 2013).

Par ailleurs, la protéine PTEN est un inhibiteur des PI3K dont l'expression est diminuée de 30% dans les carcinomes épidermoïdes des VADS (Squarize *et al.*, 2013), le gène *PTEN* présentant également des délétions homozygotes dans 10% des HNSCC (Okami *et al.*, 1998). D'un point de vue fonctionnel, l'inactivation de cette protéine a pour conséquence une augmentation de l'angiogenèse (Squarize *et al.*, 2013).

2.2.3. La voie JAK/STAT

STAT-3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription-3*) est un facteur de transcription qui peut être phosphorylé sur des résidus aminoacyles par diverses protéines kinases. Il peut être phosphorylé au niveau du résidu tyrosine 705 par la protéine JAK qui est elle-même activée par des récepteurs de cytokines (ex : récepteurs de l'IL-6 ; Zhong *et al.*, 1994) et de facteurs de croissance (ex : l'EGFR ; Zhong *et al.*, 1994), mais aussi par protéines kinases solubles comme Src (Yu *et al.*, 1995). De plus, STAT-3 peut être phosphorylé au niveau du résidu serine 727 par des sérines kinases (ex : protéine kinase C ; Jain *et al.*, 1999). Ces

phosphorylations induisent la dimérisation de STAT-3 ce qui favorise sa translocation dans le noyau et son activité transcriptionnelle (Yokogami *et al.*, 2000).

En raison de l'activation de certaines voies de signalisation, notamment celle de l'EGFR, STAT-3 est souvent surexprimé et phosphorylé dans les carcinomes épidermoïdes des VADS (Zhong *et al.* 1994 ; Arredondo *et al.*, 2006). Dans certains cas, l'inhibiteur de STAT-3, SOCS-1, est sous-exprimé par hyperméthylation de son promoteur ce qui conduit à l'activation de STAT-3 par la voie du récepteur IL-6/JAK (Lee *et al.*, 2006). Cependant, dans les carcinomes épidermoïdes des VADS non concernés par l'hyperméthylation de SOCS-1, l'activation de STAT-3 se fait par l'intermédiaire des récepteurs EGFR et IL-6R (Lee *et al.*, 2006).

3. Prise en charge des carcinomes épidermoïdes des VADS et biomarqueurs

3.1.Chirurgie

La chirurgie a longtemps été considérée comme un traitement de référence des carcinomes épidermoïdes des VADS, et ce, quel que soit leur grade. Cependant, compte-tenu de la localisation de ces cancers, l'exérèse chirurgicale de la tumeur affectant certains organes peut entraîner des gênes importantes pour le patient (dysphonie, dysphagie...). Pour ces raisons, la chirurgie est surtout employée dans les cas de tumeurs de faible grade (T1/T2) ou après récurrence d'un cancer déjà traité par radiothérapie. Dans certains cas, les tumeurs de haut grade (T3/T4) peuvent également être traitées par chirurgie, suivi d'un traitement par radiothérapie.

3.2.Radiothérapie

La radiothérapie (RT) est utilisée dans 3 cas :

- Utilisée seule (radiothérapie exclusive) lorsque la tumeur est inopérable ;
- De façon adjuvante à la chirurgie (avant, pendant ou après) afin d'améliorer le contrôle locorégional ;
- En traitement de rattrapage dans les cas de persistance ou de récurrence.

Un traitement radiothérapeutique conventionnel consiste à irradier la tumeur à une dose de 2 Gy/jour, 5 jours par semaine sur une durée de 7 semaines (soit une dose totale de 70 Gy). Bien que la balistique soit de plus en plus précise, l'inconvénient majeur de ce type de traitement

résulte de sa forte toxicité pour les tissus sains environnants, toxicité qui induit des effets secondaires tels que l'odynophagie, la mucite, la xérostomie ou la dysphagie.

Afin de réduire ces effets indésirables et d'optimiser l'efficacité du traitement radiothérapeutique, des améliorations concernant les techniques et les protocoles ont été proposées, notamment avec l'apparition du fractionnement accéléré, de l'hyperfractionnement, de la Radiothérapie Conformationnelle avec Modulation d'Intensité (RCMI), de l'arc thérapie ou de la tomothérapie.

Le fractionnement accéléré est l'administration de la même dose totale d'irradiation sur un temps de traitement plus court, le but étant de réduire la croissance tumorale entre deux séances de traitement. Cette méthode améliore légèrement la survie globale des patients (+ 2% à 5 ans) ainsi que le contrôle locorégional (+ 6,4% à 5 ans) (Bourhis *et al.*, 2006).

L'hyperfractionnement consiste à irradier la tumeur plusieurs fois par jour avec une dose réduite par fraction (généralement comprise entre 1,1 et 1,2 Gy par fraction). L'objectif est de diminuer la toxicité tardive liée à la radiothérapie et donc de limiter les effets secondaires handicapants. Ce type de traitement a montré une meilleure survie globale des patients 5 ans après leur traitement (gain de 8%) mais sans amélioration du contrôle locorégional (Bourhis *et al.*, 2006).

La RCMI consiste à irradier les tumeurs selon des angles d'irradiation spécifiques à chaque patient et en variant la dose en chaque point du faisceau. Ceci permet de délivrer des doses importantes dans le volume tumoral tout en épargnant les tissus sains environnants, diminuant de ce fait les effets secondaires de la radiothérapie. La RCMI a montré de bons résultats lorsqu'elle est utilisée à la suite d'une chirurgie (Survie globale à 3 ans : RCIM définitive : 46,5% ; RCIM post-opératoire : 81,1%) ou en association avec une chimiothérapie adjuvante (survie globale à 3 ans : RCIM seule : 59,7% ; RCIM et chimiothérapie : 74,1%) (Yang *et al.*, 2013).

L'arc thérapie est une irradiation circulaire en continu avec une adaptation de la position des lames du collimateur en fonction de la présence de la cible et des organes à risque. Cette technique permet un traitement très précis et de durée inférieure à la RCMI (Verbakel *et al.*, 2009).

La tomothérapie est dérivée de la RCMi avec couplage de l'accélérateur à un scanner, le but étant, comme pour la RCMi, d'épargner le plus possible les tissus sains. L'utilisation de la tomothérapie et de l'arc thérapie dans les carcinomes épidermoïdes des VADS est actuellement étudiée au Centre Léon Bérard dans le cadre d'un projet l'INCa (<http://www.e-cancer.fr/soins/les-traitements/radiotherapie/les-equipements-de-haute-technicite>).

Enfin, **l'hadronthérapie** par ions carbone est une technique émergente qui a montré d'excellents résultats dans la prise en charge de cancers résistants des VADS, comme les carcinomes adénoïdes kystiques (Mizoe *et al.*, 2012 ; Jensen *et al.*, 2015) mais également dans d'autres types de cancers (Jensen *et al.*, 2015 ; Kamada *et al.*, 2015). Cependant, cette technique d'irradiation n'est actuellement disponible que dans quelques pays comme l'Allemagne et le Japon et plus récemment l'Italie.

3.3.Chimiothérapie

La chimiothérapie (CT) peut être utilisée en complément de la radiothérapie selon quatre approches différentes : la CT d'induction, la CT adjuvante, la CT concomitante et la CT palliative.

La CT d'induction consiste à traiter le patient avec une combinaison de plusieurs agents chimio-thérapeutiques en amont d'une irradiation ou d'une chirurgie. La CT d'induction permet d'évaluer la réponse de la tumeur à la chimiothérapie afin d'aider les cliniciens à choisir entre la chirurgie et la radiothérapie. En effet, si un patient répond favorablement à la CT d'induction, la tumeur est dite chimio- et radiosensible et un traitement par irradiation pourra par la suite être envisagé. En revanche, un patient mauvais répondeur à la CT d'induction aura également de fortes chances de répondre défavorablement à une radiothérapie ; ces patients seront alors orientés vers la chirurgie (Forastière *et al.*, 2003). Ceci a pour avantage d'augmenter la préservation des organes sains en diminuant le nombre de chirurgies et, dans certains cas, de pouvoir orienter les patients non-opérables vers d'autres traitements, comme la radiothérapie. Comparativement à la radiothérapie seule, la CT d'induction permet également le ciblage des métastases avec une diminution de leur nombre après traitement (Forastière *et al.*, 2003 ; Pignon *et al.*, 2009 ; Ma *et al.*, 2013). Malheureusement, cette méthode ne présente pas de gain de survie significatif, ni un meilleur contrôle locorégional. A l'heure actuelle, l'utilisation d'une combinaison entre le cisplatine, les taxanes et le fluorouracile (5FU) semble être la plus efficace (Vermorken *et al.*, 2007 ; Qin *et al.*, 2012).

La CT concomitante consiste à utiliser un agent chimio-thérapeutique en parallèle à la radiothérapie. Les agents chimio-thérapeutiques peuvent être administrés soit en mono-chimiothérapie, soit en poly-chimiothérapie. En mono-chimiothérapie, le cisplatine est l'agent qui a donné les meilleurs résultats, ce qui en fait le traitement standard associé à la radiothérapie (Pignon *et al.*, 2009). En poly-thérapie, les associations incluant les sels de platine (cisplatine ou carboplatine) et le 5FU ont montré des bénéfices du même ordre de grandeur (Pignon *et al.*, 2009). L'avantage de la CT concomitante est qu'elle permet d'une part de préserver les organes sains, avec une diminution des laryngectomies par exemple (Forastière *et al.*, 2003) et d'autre part d'obtenir un gain de survie significatif des patients par rapport à la radiothérapie utilisée seule (+ 6% à 5 ans) (Pignon *et al.*, 2009). Cependant, les effets secondaires liés à ce type de traitement sont importants avec une nette dégradation de la qualité de vie des patients (mucites de grade 3 ou 4, cytopénie, fortes nausées et vomissements, toxicité rénale et nerveuse) (Osman *et al.*, 2013).

La CT adjuvante permet de traiter par CT +/- radiothérapie des tumeurs résiduelles après une intervention chirurgicale et/ou un traitement par radiothérapie. Ainsi, deux études ont montré une meilleure efficacité de la CT adjuvante utilisée avec la radiothérapie après chirurgie incluant un meilleur contrôle locorégional et une augmentation significative de la survie des patients à 5 ans (Bernier *et al.*, 2004 ; Cooper *et al.*, 2004).

La CT palliative a pour but de prolonger la vie du patient tout en améliorant sa qualité de vie. Les CT palliatives font souvent appel à une monothérapie ou à une poly-thérapie à l'aide de méthotrexate, de sels de platine, de 5FU, de taxanes ou d'anticorps anti-EGFR. En dépit du fait que plusieurs essais de traitements combinant diverses associations aient été étudiés, seule l'association entre le cisplatine, le 5FU et un anticorps anti-EGFR a jusqu'à présent montré une augmentation significative de la survie des patients (Vermorken *et al.*, 2008).

3.4. Les thérapies ciblées

Dans cette quête perpétuelle de nouveaux traitements destinés à améliorer la survie des patients atteints d'un cancer des VADS de haut grade, de nouvelles approches ont été proposées et expérimentées afin d'accroître la réponse aux traitements classiques.

Parmi celles-ci, une stratégie prometteuse concerne le ciblage de l'EGFR, que ce soit par un inhibiteur de tyrosine kinases associées au récepteur ou bien par un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur lui-même, comme le Cetuximab. L'utilisation de cet anticorps, en

association avec la radiothérapie, a amélioré de façon significative le contrôle locorégional des cancers de stade avancé (24,4 mois *versus* 14,9 mois pour la radiothérapie seule) ainsi que la survie à 5 ans des patients (45,6% de survie *versus* 36,4% pour la radiothérapie seule) (Bonner *et al.*, 2006 ; Bonner *et al.*, 2010). Cependant, il faut signaler qu'une légère augmentation des métastases a été rapportée dans la première étude de Bonner, mais pas dans la seconde. D'autres anticorps anti-EGFR tels que le Panitumumab et le Nimotuzumab sont actuellement à l'étude [essais cliniques de phase 3 pour le Panitumumab (Vermorken *et al.*, 2013) et phase 2 pour le Nimotuzumab (Reddy *et al.*, 2014)] et ont également donné des résultats prometteurs avec une bonne tolérance de la part des patients et une augmentation de leur survie globale ou de leur survie sans récurrence (Tableau 1).

	RT	CRT	RT + Nimo	CRT + Nimo
Survie globale à 5 ans	26 %	26 %	39 %	57 %
	CT	CT + Pani		
Survie globale Médiane	9,0 mois	11,1 mois		
Survie sans progression Médiane	4,6 mois	5,8 mois		

Tableau 1 : Résumé des résultats des études cliniques concernant le Nimotuzumab (Nimo) et le Panitumumab (Pani) (Vermorken *et al.*, 2013 ; Reddy *et al.*, 2014).

Le deuxième type de traitement ciblant la voie de l'EGFR concerne l'utilisation d'inhibiteurs des tyrosine kinases, comme le Gefitinib et l'Erlotinib. Cependant, les essais cliniques de phase II réalisés jusqu'à présent n'ont pas encore montré de réel bénéfice en termes de contrôle locorégional ou de survie des patients (Rodriguez *et al.*, 2012 ; Martin *et al.*, 2012).

La deuxième grande voie de signalisation dont le ciblage a été étudié dans les cancers des VADS est celle du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Comme pour l'EGFR, deux approches différentes ont été mises au point : l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-VEGF (le Bevacizumab) d'une part ou l'utilisation d'inhibiteurs de son récepteur (le Vantetanib, le Sunitinib et le Sorafenib), d'autre part. Alors que les études cliniques concernant

les inhibiteurs de VEGFR sont en cours, des résultats contradictoires ont été rapportés avec l'utilisation du Bevacizumab, et ce, en fonction du type d'association thérapeutique réalisé. En effet, alors qu'une association avec Bevacizumab/RCMI a montré une amélioration de la survie des patients à 2 ans (Fury *et al.*, 2012), l'association Bevacizumab / 5FU / hydroxyurée / irradiation a au contraire montré une augmentation de la progression locorégionale de la tumeur (Salama *et al.*, 2011).

Enfin, des essais précliniques sont en cours afin de tester l'efficacité d'autres nouveaux agents thérapeutiques, tels que des inhibiteurs du protéasome (Bortezomib), de la cyclo-oxygénase-2 (Celecoxib) ou bien des inhibiteurs de la voie PI3K/Akt/mTOR (Rapamycin).

3.5. Les combinaisons de biomarqueurs

Actuellement, il n'existe pas de biomarqueurs validés permettant de décider du traitement le plus adapté pour un individu donné. Il est cependant fondamental de pouvoir disposer de signatures biologiques et moléculaires fiables afin d'orienter les patients vers le traitement le plus adapté et d'augmenter ainsi leurs chances de survie tout en diminuant les effets secondaires associés aux traitements.

Certains facteurs biologiques tels que l'évaluation de l'hypoxie ou de la prolifération cellulaire pourraient en faire partie. **L'état hypoxique** peut être évalué en injectant par exemple du Pimonidazole au patient par voie intraveineuse avant de réaliser une biopsie tumorale. Cette molécule va alors former des adduits détectables par immunohistochimie (IHC) dans les cellules hypoxiques (Kaanders *et al.*, 2002). Une deuxième approche consiste à quantifier, toujours *via* des techniques d'IHC, la protéine HIF1 α présente dans les régions hypoxiques des tumeurs. L'estimation du niveau hypoxique de la tumeur par ces deux méthodes a montré l'existence d'une corrélation avec un faible control locorégional (Dos Santos *et al.*, 2012). **La prolifération** est, quant à elle, mesurée par la quantification d'un marqueur, l'antigène Ki67. Plus la quantité de Ki67 augmente, plus le risque de rechute locorégional est élevé (Pereira *et al.*, 2012). Le niveau d'expression de l'EGFR, stimulateur important de la croissance cellulaire, peut également être considéré comme un marqueur de la prolifération.

D'autres biomarqueurs ont été proposés [PTEN (da Costa *et al.*, 2014), ALDH1A1 (Qian *et al.*, 2014), Bmi-1 (Häyri *et al.*, 2010) etc] mais leur utilisation en tant que marqueur unique est souvent insuffisante pour prédire la réponse tumorale aux différents traitements. C'est pourquoi l'utilisation d'un panel de marqueurs moléculaires est la stratégie qui est de plus

en plus suggérée. De nombreuses études ont également combiné différents marqueurs moléculaires associés ou non avec des facteurs cliniques, tels que le sexe du patient, sa consommation de tabac et/ou d'alcool... Les marqueurs moléculaires les plus couramment utilisés sont la présence d'une infection par HPV, l'expression de la protéine p53, de l'EGFR, des protéines de la famille Bcl-2 ou des protéines impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire (p16, cycline D1), ainsi que la phosphorylation de la protéine Akt (Buffa *et al.*, 2004 ; Kumar *et al.*, 2007 ; Smith *et al.*, 2010 ; Farnebo *et al.*, 2011 ; Chang *et al.*, 2013a ; Dionysopoulos *et al.*, 2013). Les microARNs font également l'objet de nombreuses études en tant que marqueurs prédictifs potentiels (John *et al.* 2013).

Chapitre II - Effets physiques des radiations ionisantes

1. Interactions des rayonnements ionisants avec la matière : cas des photons

Les radiations électromagnétiques ne possèdent ni masse, ni charge et peuvent se propager sous forme d'ondes (ondes radio, micro-ondes...) ou de particules, appelés photons (radiations X, radiations γ). Ces radiations vont toutes à la vitesse de la lumière, mais elles ont des longueurs d'onde et des énergies différentes. Ainsi, les particules électromagnétiques ayant une énergie inférieure à l'UV sont non-ionisantes et celles ayant une énergie supérieure sont ionisantes (UV, rayons X et rayons γ).

En radiothérapie, les radiations utilisées sont les photons X, qui proviennent du réarrangement des électrons de cortèges électroniques par bombardement d'un métal lourd par un faisceau d'électrons (tubes à rayons X, accélérateurs), ou les photons γ , qui sont produits lors d'une désintégration nucléaire (source de Cobalt, Césium...). Quelle que soit leur origine, ces photons ont les mêmes propriétés.

Lorsqu'un faisceau de rayons X ou γ pénètre dans la matière, il interagit avec les particules du milieu jusqu'à la disparition des photons constituant le faisceau. L'interaction des rayonnements avec la matière est caractérisée par leur transfert d'énergie linéique (TEL) qui représente la densité d'énergie absorbée par le milieu selon la longueur parcourue. Il est défini par la formule suivante :

$$\text{TEL} = dE / dl$$

où dE est l'énergie moyenne transférée à la matière, et dl est la distance parcourue par la particule. Le TEL est exprimé en keV/ μm et dépend du type de rayonnement et de son énergie. Par exemple, les rayonnements particulaires ont un TEL plus élevé que les rayonnements électromagnétiques. De plus, l'énergie déposée par le rayonnement dans la matière est différente de l'énergie émise. Elle se mesure en Gray (Gy) qui représente les Joules déposés pour 1 kg de matière.

Un photon d'énergie cinétique $E_\gamma = h\nu$ peut interagir avec la matière par effet photoélectrique, effet Compton, production de paires, diffusion de Thomson-Rayleigh ou réaction nucléaire.

1.1.L'effet photoélectrique

Lors de l'effet photoélectrique, les photons incidents transfèrent toute leur énergie (E_γ) à un électron orbital des atomes rencontrés. Cet électron, appelé photoélectron, est alors éjecté de sa couche électronique avec une énergie cinétique E_C correspondant à $E_\gamma - E_L$, où E_L est l'énergie de liaison de l'électron à sa couche électronique. Un photon peut donc arracher un électron uniquement si son énergie E_γ est supérieure à l'énergie de liaison E_L de l'électron rencontré.

La première conséquence de l'effet photoélectrique concerne le photoélectron mis en mouvement : il perd son énergie par des phénomènes d'ionisation et d'excitation du milieu environnant. La deuxième conséquence de l'effet photoélectrique est la réorganisation du cortège électronique de l'atome excité. La lacune laissée est comblée par des électrons des couches supérieures de l'atome et ce remplacement s'accompagne d'une émission d'énergie. Cette énergie dégagée peut alors causer l'émission d'un photon de fluorescence ou être absorbée par un autre électron qui est éjecté de l'atome, appelé électron d'Auger (Figure 3).

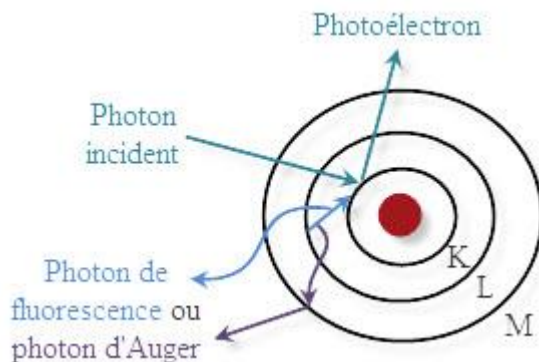


Figure 3 : L'effet photoélectrique.

1.2.L'effet Compton

Lors de l'effet Compton, les photons incidents transfèrent une partie de leur énergie quand ils entrent en collision avec les électrons présents sur la couche externe des atomes rencontrés. Ces électrons sont faiblement liés à leur atome et ont donc une énergie de liaison beaucoup plus faible que celui impliqué dans l'effet photoélectrique. Leur énergie de liaison est alors négligeable par rapport à l'énergie du photon incident (E_γ).

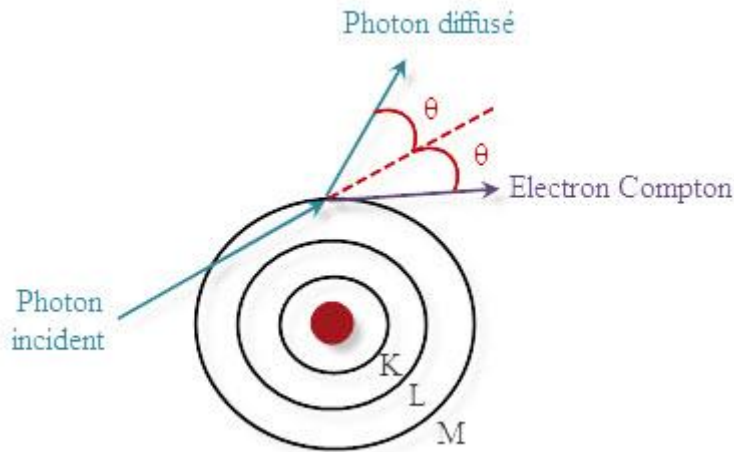


Figure 4 : L'effet Compton.

Lors de la collision, il y a production, d'une part, d'un électron Compton d'énergie cinétique E_{EC} qui est éjecté du cortège électronique et excite ou ionise les atomes environnants. D'autre part, le photon incident est diffusé avec une énergie réduite et égale à $E_{\gamma}' = E_{\gamma} - E_{EC}$.

De plus, les trajectoires du photon diffusé et de l'électron Compton sont déviées selon un angle θ avec le photon incident, et ce, en fonction de l'énergie cinétique de ce dernier. En effet, plus l'énergie cinétique du photon incident est élevée, plus l'angle θ est faible (Figure 4).

1.3. La production de paires

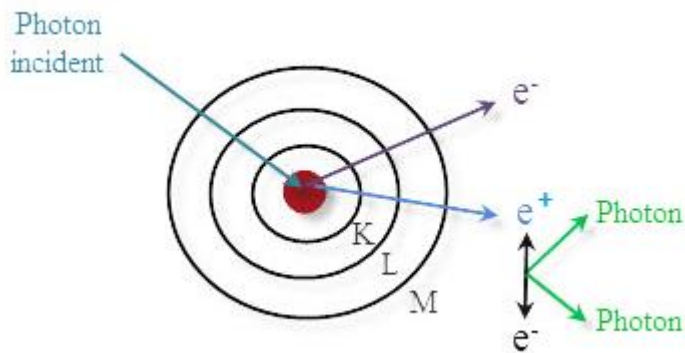


Figure 5 : La production de paires.

Quand l'énergie cinétique du photon incident est grande, le photon interagit avec le noyau de l'atome rencontré et produit un électron (e^-) et un positon (e^+) ayant la même masse et la même énergie cinétique que le photon incident. Ce phénomène est appelé production de paires et ne peut avoir lieu que si le photon incident a une énergie cinétique supérieure au double de l'énergie de masse de l'électron au repos, c'est-à-dire environ 1,02 MeV. L'électron et le

positon créés perdent leur énergie par des phénomènes d'ionisation et d'excitation du milieu. Enfin, le positon subit une réaction d'annihilation avec un électron négatif du milieu environnant, produisant un rayonnement de 2 photons γ d'énergie individuelle de 511 keV et formant un angle de 180 degrés l'un de l'autre (Figure 5).

1.4. La diffusion de Thomson-Rayleigh

La diffusion de Thomson-Rayleigh concerne les photons de très faible énergie (infrarouge, lumière visible et rayons X mous) ; elle est donc minoritaire lors de l'interaction des photons X et γ . Lors de cette réaction, le photon incident interagit avec un électron qui absorbe le photon et le réémet dans une autre direction avec la même énergie.

1.5. La réaction nucléaire

Lors de la réaction nucléaire, le photon peut interagir avec les noyaux des atomes traversés pour émettre un ou plusieurs neutrons. Cette réaction ne se produit que pour les photons de haute énergie ($E_\gamma > 10$ MeV) qui sont peu utilisés en radiobiologie.

1.6. Prédominance de chaque effet physique

L'importance relative de ces différentes interactions entre les photons et la matière dépend notamment de l'énergie cinétique des photons incidents ainsi que du numéro atomique des atomes présents dans la matière (Figure 6).

Ainsi, comme nous l'avons dit précédemment, la diffusion de Thomson-Rayleigh est majoritaire dans les faisceaux de faible énergie, alors que la réaction nucléaire ne se fait qu'en présence de photons de très haute énergie. Ces deux effets sont donc largement minoritaires en médecine.

Parallèlement, l'effet photoélectrique et la production de paires est dépendante du numéro atomique de la matière traversée. En effet, ces deux interactions sont prédominantes lorsque le numéro atomique des atomes rencontrés est supérieur à 25. Pour l'effet photoélectrique, il est majoritaire lorsque l'énergie incidente du faisceau est faible (inférieure à 0,1 MeV) et à l'inverse, la production de paires est dominante lorsque l'énergie des photons est supérieure à 1,02 MeV (Figure 6).

L'effet Compton, quant à lui, est prépondérant lorsque l'énergie cinétique des photons est intermédiaire (en moyenne à 1 MeV) et que les numéros atomiques des atomes rencontrés sont faibles. Ainsi, dans les applications usuelles des rayons X et des rayons γ , dont les énergies

sont comprises entre 50 KeV et quelques MeV, l'effet **Compton est prédominant** lors de l'irradiation de matière ayant un faible numéro atomique, tels que les tissus biologiques.

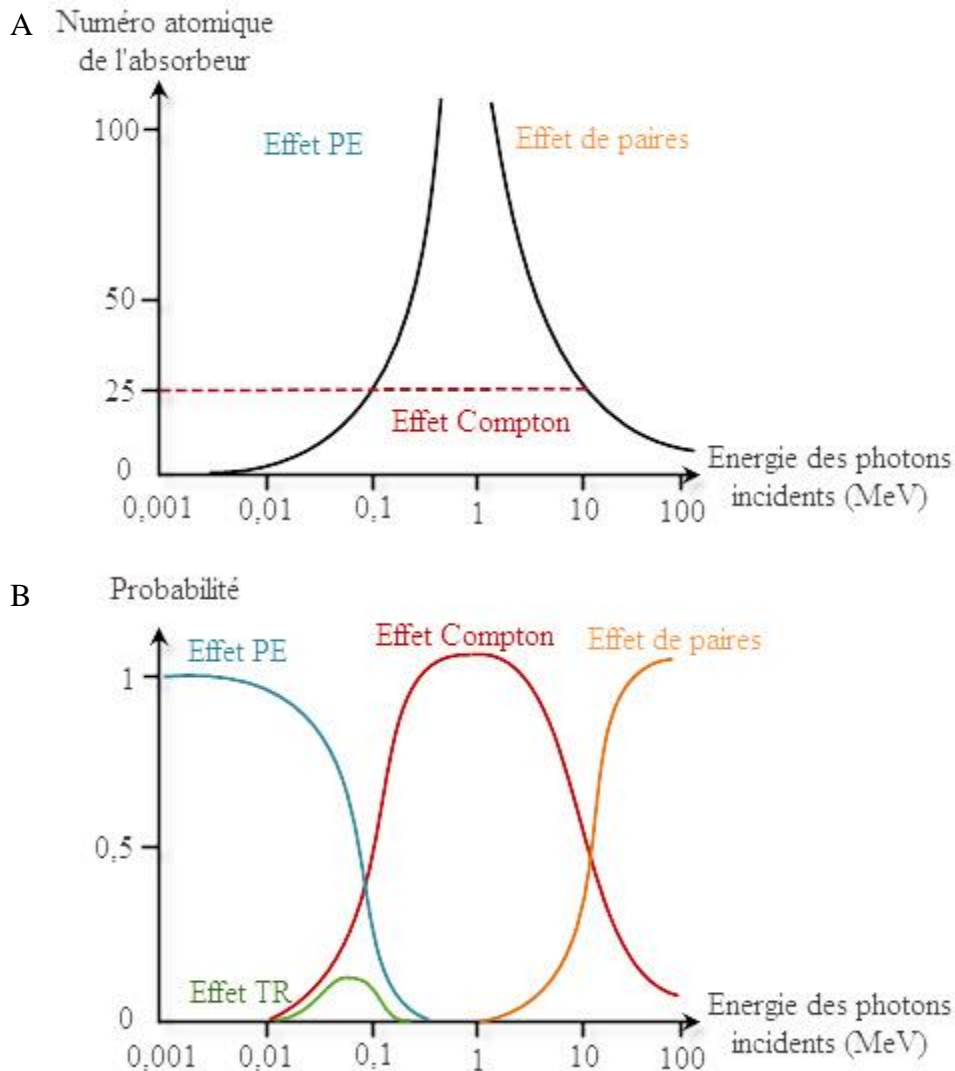


Figure 6 : Prédominance des effets physiques.

A. Prédominance des différents effets physiques en fonction du type d'absorbeur. **B.** Probabilité d'avoir chaque effet physique en fonction de l'énergie du faisceau incident. PE : photoélectrique ; TR Thomson-Rayleigh.

2. Interaction des rayonnements ionisants avec la matière : cas des hadrons

2.1. Les différents hadrons utilisés en radiothérapie

Les hadrons sont des radiations ionisantes particulières qui possèdent donc une masse. On distingue les hadrons chargés (électrons, protons, ions lourds) et non chargés (neutrons). La vitesse de leur déplacement dépend de leur énergie cinétique.

2.1.1. Les électrons

Les électrons sont produits par des accélérateurs et possèdent les mêmes caractéristiques physiques que les rayonnements β^- . Ils permettent d'irradier des lésions à différentes profondeurs selon leur énergie initiale, offrant un grand avantage sur le plan dosimétrique en permettant d'épargner les tissus profonds.

2.1.2. Les protons

Les protons sont produits par les cyclotrons et agissent en transférant leur énergie avec les électrons des milieux traversés. Bien que les protons aient à peu près la même efficacité biologique que les photons, ils ont une meilleure balistique avec le dépôt d'énergie maximal en fin de parcours sous forme de pic de Bragg ce qui permet un meilleur ciblage des tumeurs.

2.1.3. Les ions lourds : les ions carbone

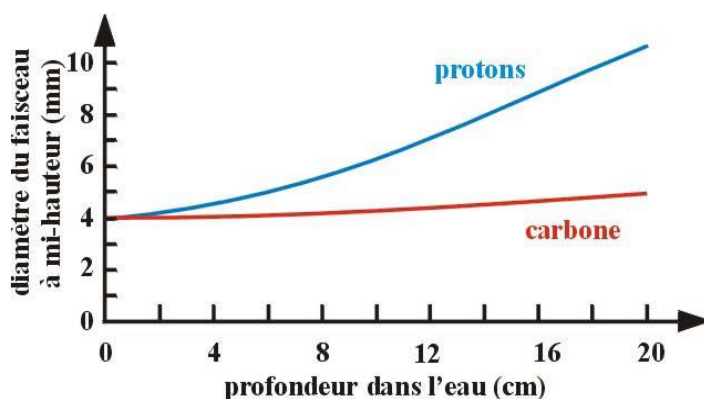


Figure 7 : La diffusion en profondeur d'un faisceau est plus élevée dans le cas des protons que dans le cas des ions carbone.

Les ions lourds tels que les ions carbonés sont produits par les synchrotrons. Ils ont les mêmes avantages que les protons, avec un dépôt d'énergie sous forme de pic de Bragg, et une efficacité biologique identique à celle des neutrons, soit de 1,5 à 3 fois plus efficaces que les photons. De plus, les ions carbonés ont une faible diffusion latérale par rapport aux protons (Figure 7).

2.1.4. Les neutrons

Les neutrons, produits dans des cyclotrons, sont indirectement ionisants car c'est leur capture par les noyaux ou leur interaction avec ceux-ci qui génère des particules ionisantes. Selon l'énergie cinétique incidente des neutrons, différentes particules peuvent en résulter : une particule α , un proton, un neutron, ou des photons. Parallèlement, le noyau cible est transformé en un nouveau nucléide, généralement radioactif.

Le parcours des neutrons est rectiligne dans la matière et, à dose égale, leur efficacité biologique est trois fois supérieure à celle des particules électromagnétiques. Cependant, leur balistique ne permet pas leur utilisation car ils interagissent avec la matière tout au long de leur parcours, et endommagent donc les tissus sains.

2.2.Effets physiques des hadrons

Contrairement aux photons, les hadrons sont des particules atomiques possédant une masse et une charge. Comme les photons, les hadrons interagissent avec le milieu traversé en cédant leur énergie cinétique par différents processus dépendant essentiellement de leur vitesse. Trois mécanismes peuvent être impliqués dans ces interactions : la collision élastique avec les noyaux, la collision inélastique avec les électrons et la fragmentation nucléaire.

Les **collisions élastiques** sont majoritaires dans le cas des projectiles de faible vitesse. L'énergie de la particule et du noyau impliqué ne varient pas pendant et après la collision.

Lors de **collisions inélastiques**, une partie de l'énergie de la particule est transférée à un ou plusieurs électrons de l'atome cible. Si l'ion incident possède des électrons, sa configuration électronique peut être modifiée au cours de la collision. La nature des modifications sur l'ion incident et sur l'atome cible dépend des excitations et des ionisations mises en jeu lors de la collision.

Enfin, la **fragmentation nucléaire** survient au cours de la pénétration du faisceau dans le milieu. Cette fragmentation induit la formation d'éléments radioactifs qui vont engendrer des dépôts de dose au-delà de la cible définie.

2.3.Atténuation des rayonnements dans le milieu

Quand un faisceau pénètre dans un milieu, l'intensité du rayonnement et le profil d'excitation et d'ionisation des molécules le long de la trajectoire diffèrent selon le type de particule.

Dans le cas des photons, l'intensité de la dose déposée augmente fortement dans les premiers centimètres de profondeur du milieu traversé et diminue de façon progressive le long de la trajectoire. L'augmentation du dépôt de dose au début correspond à la mise en équilibre électronique et au développement de « gerbes » d'électrons. Ensuite, l'atténuation est due principalement à l'atténuation du faisceau de photons en raison de l'interaction des photons et des atomes du milieu (Figure 8).

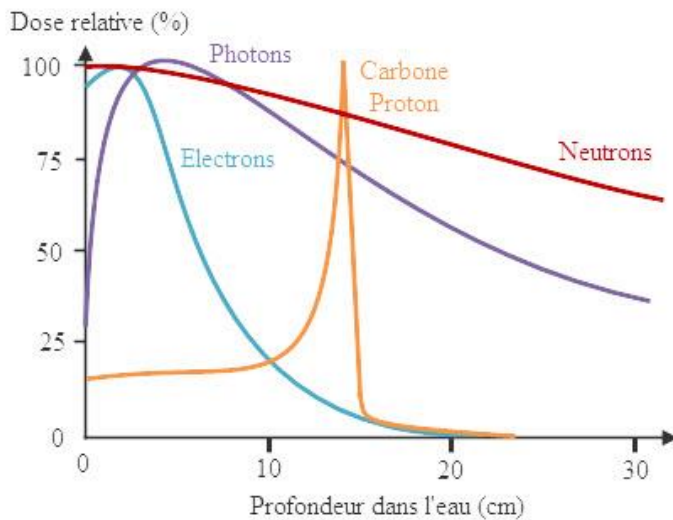


Figure 8 : Comparaison des dépôts de doses pour des photons, des électrons et des ions carbone.

On remarque la précision de ce dépôt en profondeur pour les ions carbone et les protons : c'est le pic de Bragg.

Dans le cas d'un rayonnement d'électrons, au fur et à mesure que l'énergie apportée par électron incident se dissipe, il se produit une cascade de photons et d'électrons. Compte tenu de la faible masse de l'électron, la dose délivrée par celui-ci se dissipe fortement et rapidement.

Enfin, les protons et les ions carbones déposent de petites quantités d'énergie dans les premiers tissus rencontrés (quand leur vitesse est très élevée) et déposent la plupart de leur énergie juste avant que les particules ne s'arrêtent. Cette libération d'énergie sous forme d'un pic très étroit est appelée pic de Bragg (Figure 8). Ceci rend les protons et les ions carbone très adaptés au traitement de tumeurs profondes, de petite taille et voisines des tissus sains radiosensibles. Ce comportement permet ainsi de déposer une dose très élevée à la tumeur tout en épargnant les tissus sains. Cependant, le pic de Bragg étant très étroit en profondeur, il est nécessaire de produire un étalement de celui-ci pour traiter une tumeur de grande dimension dans tout son volume. Le pic de Bragg étalé est obtenu en superposant plusieurs pics de Bragg simples par variation pas à pas de l'énergie du faisceau (Figure 9).

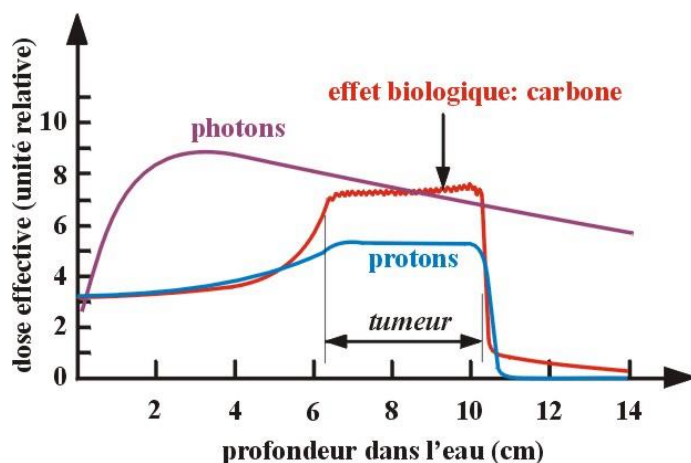


Figure 9 : Courbes de rendement en profondeur des photons, des protons et des ions carbone.

Pour traiter en profondeur les tumeurs de grand volume, il est nécessaire de superposer des pics de Bragg de différentes énergies et de moduler leur intensité pour avoir une répartition homogène du dépôt de dose.

3. Effets physico-chimiques des radiations ionisantes

Les molécules ionisées et excitées lors de la phase physique décrite précédemment réagissent entre elles et avec les molécules avoisinantes. On distingue l'effet physico-chimique direct, dont la cible est représentée par les macromolécules cellulaires, et l'effet physico-chimique indirect qui est la conséquence de l'attaque des macromolécules par les radicaux libres issus de la radiolyse de l'eau.

3.1. Effet physico-chimique direct

Les radiations ionisantes peuvent interagir directement avec les molécules organiques constituant les cellules. Ces molécules vont alors être ionisées ou excitées, entraînant par la suite, soit une émission d'un photon de fluorescence et retour à l'état fondamental, soit une rupture de la liaison chimique covalente et formation de radicaux R^* hautement réactifs. Les conséquences biologiques sont importantes pour l'ADN dont la fonction est vitale pour la cellule.

3.2. Effet physico-chimique indirect

L'effet physico-chimique indirect fait intervenir la radiolyse de l'eau. En effet, l'eau, élément présent à 80% dans les tissus biologiques, est ionisée ce qui provoque la formation de radicaux libres hautement réactifs. Ce type d'effet est majoritaire dans les rayonnements de faible TEL.

De façon minoritaire, l'eau peut être excitée (Figure 10.A.). Les molécules d'eau excitées ainsi formées se décomposent en deux espèces radicalaires H^* et HO^* (Figure 10.B.).

L'eau peut aussi être ionisée pour former un radical-cation $\text{H}_2\text{O}^{+\bullet}$ et un électron (Figure 10.C.). Ce radical-cation est décomposé en un radical HO^\bullet et un proton (Figure 10.D.). Ce radical HO^\bullet peut ensuite réagir avec un deuxième radical conduisant à la formation de peroxyde d'hydrogène (Figure 10.E.). De plus, l'électron éjecté lors de la formation du radical-cation peut à son tour former une espèce radicalaire, H^\bullet lors d'une réaction avec l'ion H_3O^+ . Dans le cas contraire, il est piégé dans l'eau pour former un électron aqueux (Figure 10.F.). Cet électron aqueux peut donner à son tour des espèces radicalaires en interagissant avec une molécule d'eau ou avec un ion hydronium (Figure 10.G.).

Les radicaux libres ainsi formés sont responsables des effets indirects de la radiolyse et peuvent réagir avec d'autres molécules pour former des radicaux libres oxygénés (RLO) tels que des anions superoxydes $\text{O}_2^{\bullet-}$, des radicaux peroxydes RO_2^\bullet ou des radicaux alkoxydes RO^\bullet . Ces RLO sont ensuite capables de réagir avec des molécules voisines comme l'ADN et donc de le modifier.

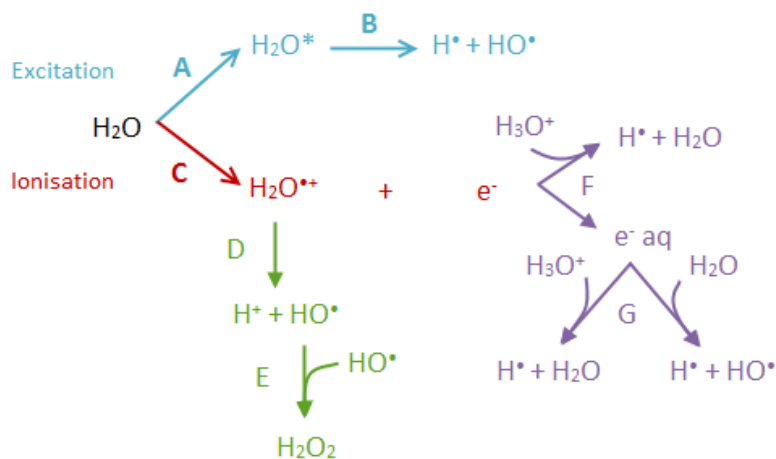


Figure 10 : Radiolyse de l'eau.

Chapitre III - Effets biologiques des radiations ionisantes

Les radiations ionisantes interagissent avec les molécules biologiques entraînant de ce fait des lésions au niveau des différents constituants de la cellule. Ces lésions induisent des dysfonctionnements cellulaires pouvant aboutir à la mort de la cellule. On peut distinguer des effets biologiques déterministes et des effets biologiques stochastiques. **Les effets déterministes** sont les effets immédiats des radiations ionisantes dont la gravité est proportionnelle à la dose au-delà d'un certain seuil. **Les effets stochastiques** sont des événements tardifs dont la probabilité d'apparition dépend de la dose (et non leur gravité) et de l'individu. Les effets stochastiques représentent le risque d'avoir un effet des rayonnements ionisants avec une gravité constante.

1. Effets sur l'ADN et réparation

1.1. Dommages à l'ADN radio-induits

Les radiations ionisantes induisent plusieurs types de dommages sur l'ADN nucléaire : elles peuvent provoquer des cassures des chaînes d'ADN, des modifications de bases ainsi que des modifications structurales de l'ADN.

1.1.1. Les ruptures de chaîne

Les radiations ionisantes peuvent créer deux types de cassures de l'ADN : les cassures simple-brin (CSB) et les cassures double-brins (CDB). **Les cassures simple-brin** sont provoquées par l'oxydation du désoxyribose, menant à la rupture de la liaison phosphodiester entre le phosphate et le désoxyribose (Evans *et al.*, 2004). Ceci va alors induire l'écartement des deux brins avec pénétration des molécules d'eau dans la brèche, rompant ainsi les liaisons hydrogène entre les brins d'ADN. Le nombre de CSB formées augmente avec la dose mais ces lésions sont réparées très rapidement, leur conférant un faible impact sur la viabilité cellulaire.

Les cassures double-brins sont provoquées soit par un seul radical hydroxyle sur le désoxyribose avec transfert du radical formé sur le brin opposé, soit par deux radicaux hydroxyles traversant la même région dans un intervalle de temps insuffisant pour la réparation

de la première cassure (Dikomey *et al.*, 1998). Comme pour les CSB, le nombre de CDB formées est proportionnel à la dose. Cependant, ces lésions étant plus difficiles à réparer, elles sont plus délétères pour la cellule et jouent un rôle important dans la mort cellulaire radio-induite.

1.1.2. Les modifications de bases

Les bases puriques et pyrimidiques ainsi que les oses constituant l'ADN peuvent être oxydés par les radicaux hydroxyles. **L'oxydation des bases** se traduit par un grand nombre de modifications, dont la plus fréquente est la 8-oxo-7, 8-dihydrodéoxyguanine (8-oxoguanine). On peut également obtenir les 8-oxo-7,8-dihydroadénine (8-oxoadénine), 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine, 5-hydroxycytosine, 5-hydroxyuracile et 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymidine (Cadet *et al.*, 1999).

1.1.3. Les modifications structurales de l'ADN

Les radiations ionisantes peuvent également créer des modifications structurales de l'ADN telles que des sites abasiques, des pontages ADN-ADN ou ADN-protéine ainsi que des aberrations chromosomiques et chromatidiennes. Les **sites abasiques** sont les conséquences des oxydations de bases et sont provoquées par la déstabilisation de la liaison N-glycosidique entre la base azotée et le désoxyribose (pour revue, Krokan & Bjørås, 2013).

Les **pontages ADN-ADN** peuvent être intra- ou inter-brins. Elles résultent principalement de la formation d'une liaison entre deux bases. De plus, les radiations ionisantes peuvent créer des liaisons covalentes entre l'ADN et des protéines nucléaires, menant à des **pontages ADN-protéines**.

Enfin, les **aberrations chromosomiques** (translocations, délétions, inversions, anneaux dicentriques, centriques ou acentriques) sont retrouvées après irradiation des cellules en phase G0, G1 ou S du cycle cellulaire. Les aberrations chromatidiennes (cassures, anneaux centriques et acentriques, inversions paracentriques, translocation de chromatides) surviennent lors de l'irradiation des cellules en phase G2/M. La plupart de ces aberrations sont létales pour la cellule, seules les translocations ou inversions peuvent perdurer dans les générations suivantes.

1.1.4. Les sites de multi-dommages

Un **site de multi-dommages** (LMDS) est provoqué par l'interaction d'un rayonnement ionisant avec la molécule d'ADN, provoquant la formation d'au moins deux dommages à l'ADN sur une courte distance (1 à 4 nm). Les lésions impliquées dans ces sites multi-dommages peuvent être des CSB, des bases oxydées ou encore des sites abasiques (Sutherland *et al.*, 2001). En raison du nombre important de lésions sur un même site et du fait de leur complexité, les systèmes de réparations sont rapidement dépassés et les erreurs de réparation sont plus fréquentes (Pearson *et al.*, 2004). Les sites de multi-dommages sont donc considérés comme fortement létaux.

1.2. Systèmes de réparation des lésions à l'ADN radio-induites

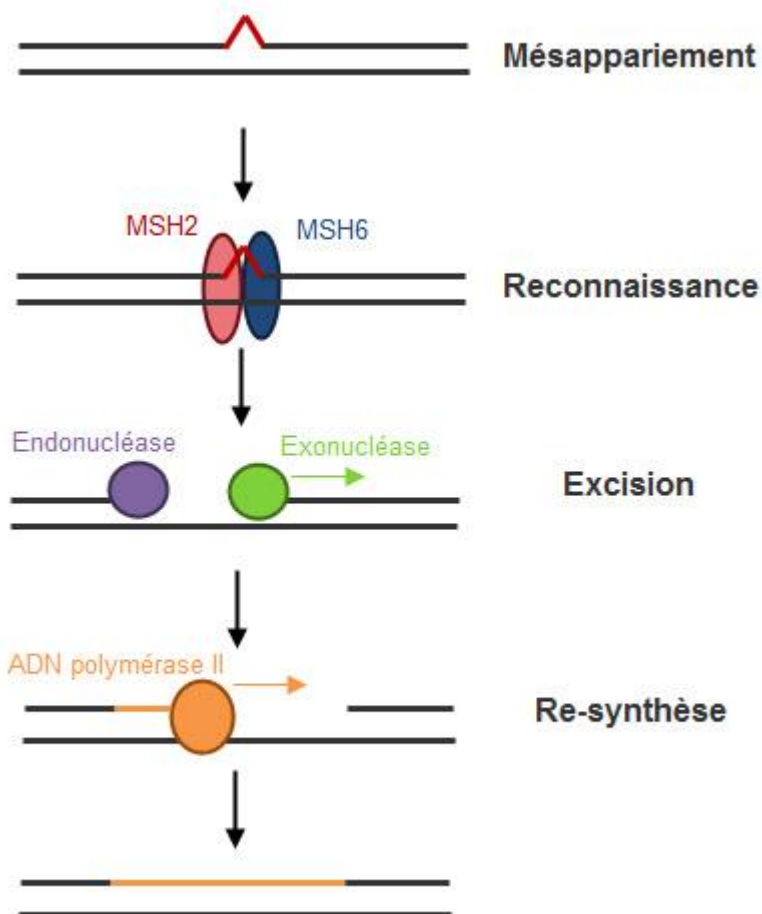


Figure 11 : Réparation des mésappariements de bases.

Au sein de la cellule, il existe plusieurs mécanismes de réparation des lésions radio-induites précédemment citées. La **réparation des mésappariements de bases** (MMR, *MisMatch Repair*) est utilisée par la cellule en cas de mutation ponctuelle d'une base. Ce

système de réparation commence par la reconnaissance du mésappariement et de la base à exciser par un complexe protéique (MSH2 et MSH6). Le brin endommagé est ensuite clivé par une endonucléase, puis dégradé par une exonucléase. Le brin complémentaire est alors re-synthétisé par l'ADN polymérase II, ce brin néosynthétisé étant ensuite suturé par une ADN ligase (pour revue, Kunkel & Erie, 2005 ; Figure 11).

La **réparation par excision de base** (BER, *Base Excision Repair*) permet de réparer les modifications de bases, les sites abasiques ainsi que les CSB. Les étapes sont similaires à la MMR avec une étape de reconnaissance suivie d'une excision de la base lésée. La reconnaissance est réalisée par des glycosylases (NTH1 pour les dérivés de bases pyrimidiques et OGG1 pour les dérivés oxydés de la guanine), enzymes qui vont également rompre la liaison N-glycosidique pour former un site abasique à la place de la base modifiée. Ce site abasique est ensuite reconnu par une apurique/aprimidique (AP) endonucléase (généralement APE1) qui se charge de cliver la chaîne principale du brin d'ADN et permet la formation d'une CSB. Enfin, une ADN polymérase permet la re-synthèse de la base (pour revue, Kim & Wilson, 2012 ; Figure 12).

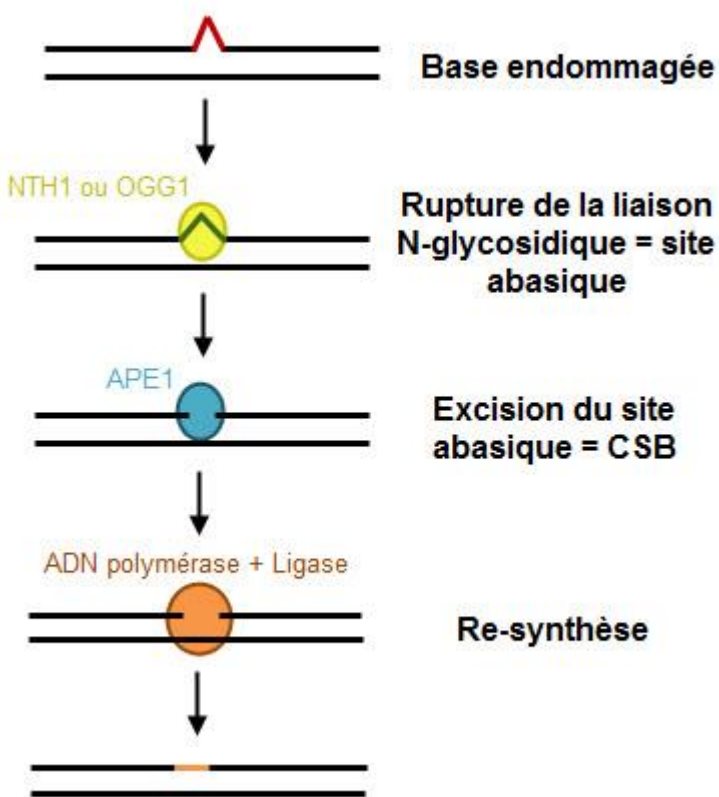


Figure 12 : Réparation par excision de base.

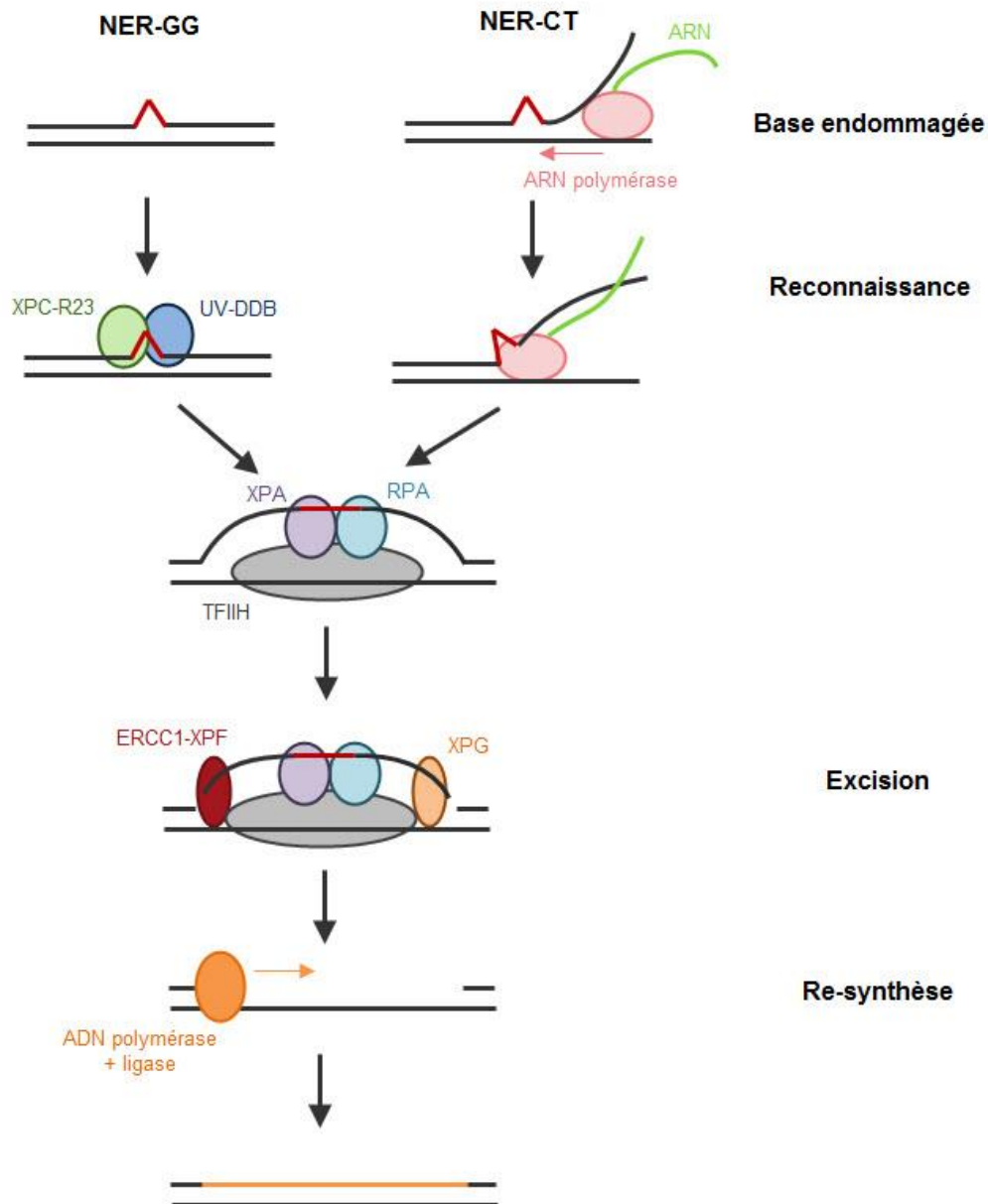


Figure 13 : Réparation par excision de nucléotide.

Comme pour la MMR et la BER, la **réparation par excision de nucléotide** (NER, *Nucleotide Excision Repair*) permet de réparer des dommages simples brin, et plus particulièrement les dommages induits par les rayonnements ultra-violets (UV). Il existe deux mécanismes de réparation par la NER faisant intervenir chacun des enzymes différentes : la NER génomique globale (NER-GG) et la NER couplée à la transcription (NER-CT). Le processus implique dans un premier temps la reconnaissance du brin endommagé. Dans le cas de la NER-GG, cette reconnaissance se fait par les complexes protéiques XPC-R23 et UV-

DDB, alors que la NER-CT est enclenchée suite à l'arrêt de l'ARN polymérase à l'endroit du dommage. Dans les deux cas, cette reconnaissance entraîne le recrutement d'autres protéines nécessaires à l'identification du dommage (TFIIH, XPA, RPA). Dans un deuxième temps, ce brin est clivé tout en conservant le brin complémentaire. Cette excision est réalisée par le complexe ERCC1-XPF en 5' de la base endommagée, et par XPG en 3'. Enfin, le brin complémentaire est utilisé par l'ADN polymérase δ pour re-synthétiser le brin manquant et une ligase permet la formation du double brin d'ADN (pour revue, Fousteri & Mullenders, 2008 ; Figure 13).

Les CDB peuvent être réparées par deux mécanismes différents : la recombinaison homologue et la recombinaison non-homologue. **La recombinaison homologue** intervient quand la chromatide sœur non-endommagée est disponible, ceci lorsque la cellule est en phase S ou G2 du cycle cellulaire. Dans ce cas, l'information est récupérée sur le chromosome homologue non-endommagé pour réparer le brin lésé. Dans un premier temps, les CDB sont détectées par le complexe MRN (Mre11, Rad50, Nbs1) qui se fixe au niveau de la lésion afin de la protéger, puis, grâce à son activité 5'-3'exonucléase, le complexe MRN clive le brin 5' permettant ainsi la formation d'un simple brin en 3'. Il y a ensuite formation d'un complexe composé des protéines RPA, Rad52 et Rad51 au niveau des simples brins, ce qui favorise l'appariement avec la chromatide sœur du chromosome homologue. La copie non endommagée est alors utilisée comme modèle pour re-synthétiser les brins manquants grâce à une ADN polymérase δ . Les jonctions Holliday qui sont alors formées sont ensuite suturées par une résolvase (San Filippo *et al.*, 2008 ; Figure 14).

La recombinaison non-homologue (NHEJ ; *Non-Homologous End Joining*) est une alternative à la recombinaison homologue lorsque le brin de la chromatide sœur n'est pas disponible, notamment lorsque la cellule est en phase G1 et au début de la phase S. Dans un premier temps, les sous-unités régulatrices Ku70 et Ku80 de la protéine DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) se fixent aux extrémités de la CDB afin de les protéger et de favoriser leur rapprochement. Une endonucléase, appelée Artémis, est alors recrutée grâce à la sous-unité catalytique de la DNA-PK et permet de couper la zone lésée. Une ADN polymérase est ensuite recrutée afin d'obtenir des bouts francs. Enfin, les extrémités sont reliées par le complexe XRCC4 / ADN ligase IV afin de reconstruire la double hélice de l'ADN (pour revue, Lieber, 2010 ; Figure 14).

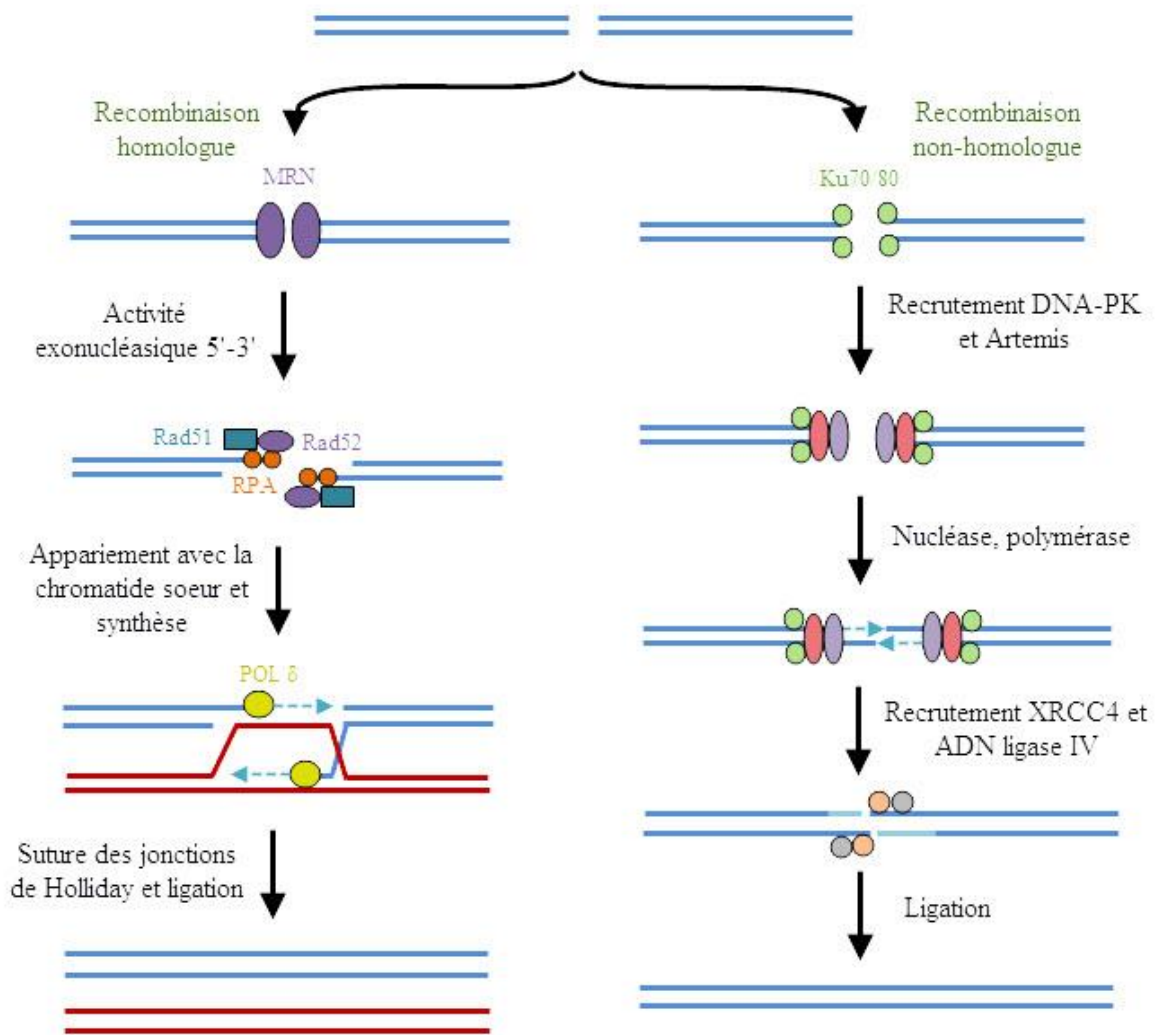


Figure 14 : Réparation des CDB.

2. Autres cibles cellulaires

2.1. Dommages oxydatifs des protéines

Les acides aminés et les protéines des milieux extra- et intracellulaires sont également des cibles pour les RLO. Les dommages formés peuvent avoir lieu sur la chaîne polypeptidique ou sur les chaînes latérales de certains acides aminés sensibles à l'oxydation. Ces modifications touchent toutes les catégories de protéines, que ce soit les protéines de structure, les enzymes ou les facteurs de transcription. Les protéines oxydées seront soit réparées, soit dégradées par le protéasome (Delatre *et al.*, 2007).

2.1.1. Oxydation de la chaîne polypeptidique

Les radicaux hydroxyles OH^\bullet induisent le départ d'un atome d'hydrogène du carbone en α de la liaison peptidique, formant ainsi un radical centré sur le carbone. En l'absence d'oxygène, deux de ces radicaux centrés sur le carbone peuvent interagir entre eux pour former des liaisons croisées intra- ou inter-chaînes (Delatre *et al.*, 2007).

L'oxygène réagit avec le radical centré sur le carbone en α par une réaction d'addition pour former un intermédiaire peroxyde. Cet intermédiaire subit alors des réarrangements et des clivages qui aboutissent à deux peptides contenant une fonction carbonyle. Les protéines carbonylées sont, entre autres, considérées comme des marqueurs du stress oxydant des protéines (Delatre *et al.*, 2007).

2.1.2. Oxydation des chaînes latérales des acides aminés

Les chaînes latérales de la plupart des acides aminés peuvent être des cibles pour les RLO, les acides aminés les plus sensibles étant les acides aminés soufrés, les acides aminés basiques et les acides aminés aromatiques (Tableau 2) (Delatre *et al.*, 2007).

Acides aminés	Agent oxydant	Produits formés
Cystéine	OH^\bullet	Acide cystéique, cystine
Méthionine	OH^\bullet	Sulfoxyde ou sulfone de méthionine
Arginine	$\text{OH}^\bullet, \text{RO}_2^\bullet$	Acide 5-hydroxy 2-aminovalérique, Semi-aldéhyde glutamique
Histidine	OH^\bullet	2-oxohistidine
Lysine	OH^\bullet	3,4 ou 5-hydroxylysine, Semi-aldéhyde glutamique
Phénylalanine	OH^\bullet	Orthotyrosine
Tryptophane	OH^\bullet	Kynurénine, composés hydroxylés
Tyrosine	OH^\bullet	Dihydroxyphénylalanine, bityrosine

Tableau 2 : Principaux produits d'oxydation de quelques acides aminés.

Les acides aminés soufrés sont particulièrement sensibles à l'oxydation, celle-ci conduisant à la formation de composés carbonylés ou de ponts disulfures (Delatre *et al.*, 2007). Pour la cystéine, ces ponts disulfures sont facilement réduits par la thiorédoxine ou le glutathion réduit. La méthionine est oxydée en sulfoxyde de méthionine puis en sulfone de méthionine. Le sulfoxyde de méthionine peut ensuite être réduit par une enzyme, la méthionine sulfoxyde réductase.

Les acides aminés basiques sont également sensibles à l'oxydation *via* leur chaîne latérale (Delatre *et al.*, 2007). L'arginine oxydée peut générer soit l'acide 5-hydroxy 2-aminovalérique, soit le semi-aldéhyde glutamique, porteur d'un groupement carbonyle. L'histidine est, quant à elle, oxydée en asparagine et/ou en dérivés aspartiques ou en oxo-histidine. Enfin, la lysine peut soit être transformée en hydroxy-lysine ou en semi-aldéhyde, soit subir une lipo-oxydation.

Les acides aminés aromatiques sont également facilement oxydés au niveau de leur cycle aromatique (Delatre *et al.*, 2007). La phénylalanine est sensible aux radicaux hydroxyles, générant des dérivés mono- et di-hydroxylés. La tyrosine est également hydroxylée par les OH^\bullet pour former de la dihydroxy-phénylalanine ou des radicaux tyrosyls qui peuvent donner des ponts tyrosine-tyrosine. Le tryptophane est également très sensible aux RLO, conduisant à la formation de nombreux composés hydroxylés sur le noyau indole ou à une ouverture du cycle pyrrole avec la formation de kynurénine. Ces modifications sont irréversibles et peuvent inactiver de nombreuses protéines.

2.2.Dommages oxydatifs des lipides

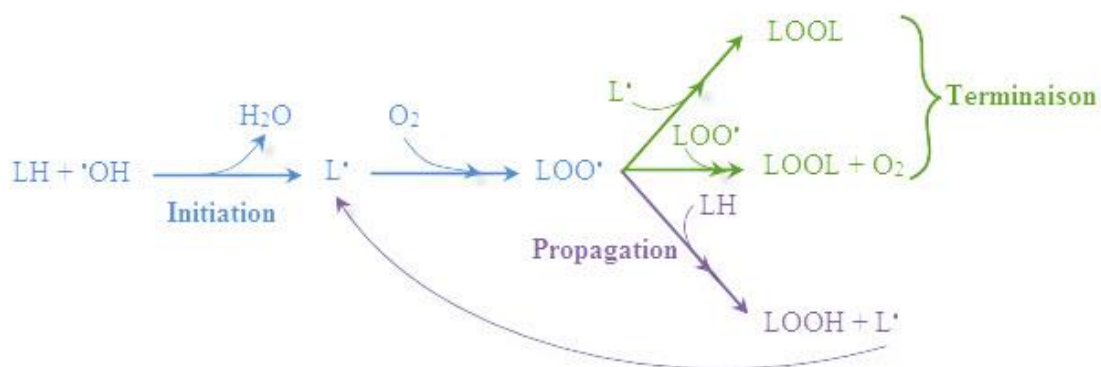


Figure 15 : Les étapes de la peroxydation lipidique.

Les acides gras polyinsaturés sont caractérisés par la présence de plusieurs doubles liaisons intercalées par un groupement méthylène, ce qui les rend très sensibles à l'oxydation par des RLO. Cette oxydation, appelée « peroxydation lipidique » est une réaction en chaîne se décomposant en trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison (Figure 15) (Delatre *et al.*, 2007).

Lors de la phase d'initiation, les RLO vont arracher un atome d'hydrogène aux acides gras polyinsaturés pour former un radical pentadienyl (L^{\bullet}). Ce composé étant très instable, il va rapidement réagir avec une molécule d'oxygène et former un radical peroxy (LOO^{\bullet}). Celui-ci va alors soit entrer en phase de propagation et réagir avec un autre acide gras polyinsaturé pour former un hydroperoxyde ($LOOH$) et un autre radical pentadienyl, soit entrer en phase de terminaison s'il rencontre un autre produit radicalaire (L^{\bullet} ou LOO^{\bullet}) pour former des esters ($LOOL$) (Delatre *et al.*, 2007).

Les hydro-peroxydes sont très instables et peuvent se décomposer en donnant de multiples molécules spécifiques de l'emplacement de la double liaison d'origine. Les composés majoritaires vont être des aldéhydes, tels que le malonyl-dialdéhyde (MDA) ou le 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE). Ces molécules sont capables de se lier à l'ADN, aux protéines et aux phospholipides, leur conférant ainsi des propriétés cytotoxiques.

De plus, la peroxydation des lipides provoque des changements de propriétés des membranes cellulaires avec une modification de leur fluidité et de leur perméabilité.

Enfin, les radiations ionisantes ont également une action indirecte sur la production de céramide, un second messenger lipidique très impliqué dans la mort cellulaire par apoptose (voir partie III.4.6.3.).

3. Arrêts du cycle cellulaire radio-induits

3.1. Généralités et régulation du cycle cellulaire

Dans le but de contrôler l'intégrité de l'information génétique transmise aux cellules filles, le cycle cellulaire présente des points de contrôle permettant la vérification du bon déroulement de l'étape précédente. Ces points de contrôle font appel à une machinerie cellulaire composée de différents complexes protéiques spécifiques à chaque étape. Ces complexes comprennent une sous-unité effectrice, les CDK (*Cycline-Dependant Kinase*) et une sous-unité régulatrice, les cyclines. Tout au long de la progression dans les différentes phases du cycle

cellulaire (G0/G1, S, G2, M), l'activation de complexes cycline/CDK différents suivant un ordre déterminé va être nécessaire afin de passer les différents points de contrôles et de progresser jusqu'à la phase suivante (Figure 16 et Tableau 3). Bien que toutes les CDK aient un taux d'expression constant tout au long du cycle cellulaire, elles sont présentes sous forme inactives. C'est l'expression des différentes cyclines à des moments précis du cycle cellulaire qui phosphorylent et activent leurs CDK associées.

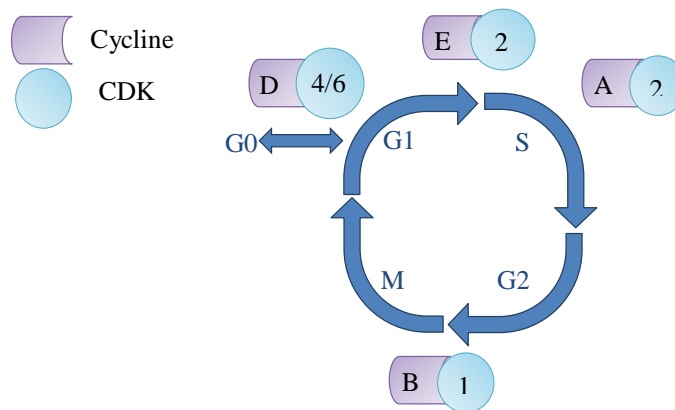


Figure 16 : Schéma simplifié du cycle cellulaire et de sa régulation.

L'ensemble des phases G1, S et G2 correspond à l'interphase. Lors de la phase S, il y a réplication de l'ADN. La phase M correspond à la mitose qui est elle-même divisée en différentes phases comprenant la prophase, la pro-métaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase.

Moment du cycle	Complexes	Rôle(s) des complexes
G1	Cycline D / CDK4 Cycline D / CDK6	Phosphorylent et inactivent la protéine Rb ("Rétinoblastoma protein"), ce qui libère les facteurs de transcription E2F qui contrôlent l'expression de gènes nécessaires pour la progression dans le cycle.
Transition G1/S	Cycline E / CDK2	Responsable de la transition G1/S. Phosphoryle la protéine Rb.
S Transition S/G2	Cycline A / CDK2	Active la réplication de l'ADN et inactive les facteurs de transcription de la phase G1. Induit la duplication du centrosome. Permet l'arrêt de la dégradation de la cycline B qui s'accumule.

G2/M	Cycline B / CDK1	Dirige la transition G2/M et active la progression de la mitose.
-------------	------------------	--

Tableau 3 : Les différents complexes cycline/CDK présents selon la phase du cycle cellulaire.

En plus de l'expression des cyclines adaptée en fonction de la phase du cycle cellulaire, il existe d'autres moyens de régulation des complexes cycline/CDK. En effet, les CDK peuvent être phosphorylées au niveau de leur résidu commun, la thréonine 160/161, grâce au facteur de transcription TFIIF (Serizawa *et al.*, 1995). De plus, certaines CDK ont besoin d'être déphosphorylées au niveau des résidus thréonine 14 et tyrosine 15, déphosphorylation réalisée par une phosphatase de la famille CDC25 (Sexl *et al.*, 1999). Enfin, il existe également des inhibiteurs de CDK (CKI, *CDK inhibitors*) composés des peptides p21^{WAF1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2} et INK4 qui vont intervenir dans différentes phases du cycle.

3.2. Arrêts du cycle cellulaire après irradiation

Il y a deux points de contrôle lors du cycle cellulaire : le premier en phase G1, appelé point de restriction, et le second en phase G2. L'exposition des cellules aux rayonnements ionisants modifie leur progression dans le cycle cellulaire avec un arrêt en phase G1 pour les cellules exprimant la protéine p53 fonctionnelle, un arrêt en phase G2 pour la majorité des types cellulaires, ainsi qu'un arrêt en phase S. Ces arrêts sont dus soit à l'inhibition des complexes cyclines/CDK, soit à l'inhibition de l'avancement de la fourche de réplication ce qui permet la reconnaissance et la réparation des dommages cellulaires radio-induits.

3.2.1. Arrêt en phase G1

L'arrêt en phase G1 peut soit être transitoire et mener à la survie ou à l'apoptose, soit être irréversible et mener à la sénescence. D'un point de vue mécanistique, l'arrêt en phase G1 est généralement associé à l'activation de la protéine p53 ainsi qu'à sa stabilisation post-traductionnelle (Kastan *et al.*, 1991 ; Nelson & Katsan, 1994). En effet, après irradiation, les lésions à l'ADN activent les kinases ATM/ATR, qui vont phosphoryler la protéine p53, soit de manière directe, soit de manière indirecte *via* la phosphorylation des protéines Chk1/Chk2 (Vousden & Lan, 2007). La protéine p53 peut alors induire l'expression de différentes CKI :

- activation des protéines p15^{INK4B/MTS2} et p16^{INK4A/CDKN2/MTS1/CDK4I}, de la famille INK4, qui permettent l'inhibition du complexe cycline D/CDK4 nécessaire à la progression en phase G1 (Shapiro *et al.*, 1998) ;
- activation des protéines p21^{WAF1} et p27^{KIP1} qui permet l'inhibition du complexe cycline E/CDK2 nécessaire à la transition G1/S (El-Deiry *et al.*, 1994 ; Hsu *et al.*, 2000).

Cependant, l'arrêt en phase G1 peut également emprunter une voie p53-indépendante par inactivation de la Cdc25A, qui est phosphorylée par les protéines Chk1/Chk2. Cdc25A est alors dégradée dans le protéasome, empêchant de ce fait l'activation du complexe cycline E/CDK2 (Nilsson & Hoffmann, 2000). De plus, les radiations ionisantes peuvent également induire l'expression du TGFβ qui active à son tour les protéines p21^{WAF1}, p27^{KIP1} et p15^{INK4B/MTS2} (Datto *et al.*, 1995).

3.2.2. Arrêt en phase S

Comme décrit précédemment, l'activation des protéines Chk1/Chk2 après irradiation inactive la protéine Cdc25A qui est dégradée par le protéasome, empêchant de ce fait l'activation du complexe cycline A/CDK2 (Nilsson & Hoffmann, 2000). L'initiation de la réplication est alors inhibée, ce qui se traduit par un arrêt en phase S. Parallèlement, la protéine p53 est également activée et augmente l'expression de la protéine p21^{WAF1} qui bloque le complexe cycline A/CDK2 nécessaire à la progression des cellules en phase S (Petrocelli *et al.*, 1996).

3.2.3. Arrêt en phase G2

Comme pour les autres arrêts du cycle, l'arrêt en phase G2 fait intervenir la protéine p53 qui active la protéine chaperonne 14-3-3. Celle-ci inactive alors la phosphatase Cdc25C, empêchant l'activation de CDK1 (Graves *et al.*, 2000) et donc inhibe la progression en phase G2.

Par ailleurs, il a été démontré que l'absence d'arrêt en phase G2 augmente l'entrée des cellules en apoptose (Bernhard *et al.*, 1994) alors qu'une majoration de cet arrêt est associée à une augmentation de la radiorésistance des cellules (Palayoor *et al.*, 1995). Cependant, la radiorésistance des cellules n'est pas corrélée avec la durée de l'arrêt en phase G2 mais plutôt au nombre de cassures de l'ADN non réparées (Dikomey *et al.*, 1998).

4. Mort cellulaire radio-induite

Comme nous l'avons rappelé précédemment, l'exposition des cellules aux radiations ionisantes entraîne des dommages cellulaires (ADN, protéines, lipides) qui vont activer des mécanismes de protection *via* l'arrêt du cycle cellulaire. Ces arrêts permettent alors aux cellules de réparer ces dommages. Lorsque les réparations sont perçues comme « convenables », la cellule reprend alors son cycle cellulaire et prolifère. Si les dommages persistent malgré les systèmes de réparation, la cellule va s'engager dans un processus de mort cellulaire.

La mort cellulaire recherchée en radiobiologie est définie comme l'incapacité d'une cellule à se diviser et à donner des cellules filles. Cependant, il existe plusieurs types de morts cellulaires : la mort cellulaire immédiate, la nécrose, l'autophagie, la senescence, la mort mitotique et l'apoptose.

4.1.Mort cellulaire immédiate

La mort cellulaire immédiate est très peu connue au niveau de ses mécanismes moléculaires. Elle survient au maximum quelques heures après une irradiation à une très forte dose et induit un phénomène inflammatoire très important.

4.2.Nécrose

La nécrose est caractérisée par un gonflement du cytoplasme et des organelles sub-cellulaires, une augmentation de la perméabilité membranaire, la lyse de la chromatine et de l'ADN et enfin une cytolysse. En général, ce type de mort cellulaire survient 24h après l'irradiation et les mécanismes cellulaires impliqués sont également mal connus. Les constituants cytoplasmiques sont extériorisés et induisent une réponse inflammatoire importante.

4.3.Autophagie

L'autophagie est un processus catabolique survenant à la suite d'un stress cellulaire et pendant lequel la cellule dégrade ses propres constituants cellulaires. Dans le cadre de l'autophagie « cytoprotectrice », cette dégradation contrôlée permet à la cellule de lui fournir l'énergie nécessaire à sa survie. Certaines cellules tumorales ont même un niveau d'autophagie basal important qui leur permet de survivre, surtout lorsqu'elles présentent des mutations oncogéniques (Yang *et al.*, 2011a). De plus, après irradiation, les cellules sont également

capables de survivre grâce à ce processus (Paglin *et al.*, 2001). Cependant, au-delà d'un certain stade, l'autophagie a une action cytotoxique sur la cellule. En effet, si les constituants cellulaires sont dégradés de façon trop importante, un traitement par irradiation peut augmenter quantitativement ou à long terme l'autophagie, ce qui la rend délétère pour la cellule (Baehrecke, 2005).

4.4.Sénescence

Bien que la sénescence ne soit pas une mort cellulaire en tant que telle, nous la décrirons dans ce paragraphe car elle correspond à la définition de la mort cellulaire privilégiée en radiobiologie, à savoir une perte de la capacité des cellules à se diviser (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Dans les cellules saines, les télomères se raccourcissent au cours des différentes réplifications jusqu'à ce qu'ils deviennent trop petits (pour revue, Campisi, 2013). A ce moment-là, la sénescence répllicative est activée, caractérisée par l'expression de la β -galactosidase (Dimri *et al.*, 1995), une sur-régulation des protéines p21^{WAF1} et p16^{INK4A} (Ohtani *et al.*, 2004), une diminution de l'expression des cyclines A et B et du PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) (Narita *et al.*, 2003). Suite à un stress exogène, tel qu'une irradiation ou un traitement par un agent chimio-thérapeutique, la sénescence peut également être induite de façon indépendante de la diminution des télomères (pour revue, Campisi, 2013). Les dommages à l'ADN induits et non réparables par la cellule vont alors provoquer l'activation constitutive de la voie ATM-p53-p21 pour aboutir à un arrêt définitif du cycle cellulaire en phase G1 (pour revue, Sabin & Anderson, 2011).

4.5.Mort mitotique

La mort mitotique est considérée comme étant la mort radio-induite la plus répandue. Elle est caractérisée par la perte de la capacité de prolifération des cellules menant au final à la mort cellulaire. La mort mitotique est principalement due à l'apparition de dommages à l'ADN stables, non réparables, mais compatibles avec une survie cellulaire. Ces dommages vont donc persister au cours des divisions cellulaires successives et conduire à des instabilités génomiques et chromosomiques (Andreassen *et al.*, 2001) caractérisées par des clones présentant des anomalies telles que des cellules géantes, binucléées ou des micronoyaux. La mort mitotique résulte donc d'une forte accumulation d'aberrations chromosomiques et de l'incapacité des cellules à achever une mitose complète. Enfin, l'entrée en catastrophe mitotique peut se faire pendant la métaphase de manière p53-indépendante ou à la suite d'une mitose avortée grâce à

l'activation de la caspase-2 (Castedo *et al.*, 2004). Après son entrée en catastrophe mitotique, la cellule meurt selon des mécanismes tels que l'apoptose avec activation des caspases, chute du potentiel du membranaire mitochondrial et libération des protéines pro-apoptotiques dans le cytosol, menant à la fragmentation de l'ADN.

4.6. Apoptose

L'apoptose, également appelée « mort cellulaire programmée », induit des modifications morphologiques de la cellule, avec condensation et vacuolisation du cytoplasme, fragmentation de l'ADN et apparition de bourgeonnements de la membrane plasmique sous forme de vésicules : les corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques sont alors reconnus par les macrophages qui les phagocytent. C'est un mécanisme rapide qui peut être amorcé pendant toutes les phases du cycle cellulaire.

4.6.1. Différentes étapes de l'apoptose

L'apoptose est classiquement décrite en trois étapes successives:

- Une étape d'initiation de l'apoptose : l'initiation de l'apoptose peut se faire par différentes voies : une voie extrinsèque, une voie intrinsèque p53-dépendante ou par une voie intrinsèque p53-indépendante. La **voie extrinsèque** de l'apoptose est activée *via* des récepteurs de mort cellulaire (Fas/APO1, TNFR1, TRAILR1, TRAILR2...) localisés sur la membrane plasmique et après fixation de leurs ligands respectifs (Fas, TNF α , TNF β ...). Les **voies intrinsèques** sont impliquées après une irradiation et sont donc détaillées dans les parties III.4.6.2. et III.4.6.3. Cependant, quelle que soit la voie activée, l'étape d'initiation mène à l'activation de protéines différentes impliquées dans l'étape régulatrice suivante (Figure 17).
- Une étape régulatrice : la régulation de l'apoptose passe par la mitochondrie qui est l'organe central d'intégration des signaux apoptotiques. Après la phase d'initiation de l'apoptose, et quelle que soit la voie empruntée, les protéines de la famille Bcl-2 vont être activées ou inhibées afin de réguler la formation de pores dans la membrane externe mitochondriale (MEM). Si la perméabilité de la MEM augmente, ce qui est un point de non-retour, celle-ci induit la chute de du potentiel de membrane, la production d'espèces réactives de l'oxygène et la libération de protéines pro-apoptotiques dans le cytosol. Parmi ces protéines on

trouve le cytochrome c qui va s'associer à d'autres protéines pour former l'apoptosome, un complexe multi-protéique nécessaire à l'entrée en phase effectrice (Figure 17). Une autre protéine appelée Smac/Diablo, localisée dans l'espace inter-membranaire mitochondrial, va pouvoir être également libérée dans le cytoplasme afin d'inhiber la protéine XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*), elle-même inhibitrice de différentes caspases (3,7 et 9) (Figure 17).

- Une étape effectrice : l'étape effectrice est amorcée par la formation de l'apoptosome, un complexe composé d'APAF-1, de la pro-caspase-9 et du cytochrome c préalablement libéré par la mitochondrie. Une fois que le cytochrome c est complexé aux autres protéines, la pro-caspase-9 est auto-activée par clivage en caspase-9 active (pour revue, Yuan & Akey, 2013). La caspase-9 active est alors libérée de l'apoptosome afin d'activer les pro-caspases effectrices 3, 6 et 7 (Figure 17). Ces caspases effectrices, exercent une activité protéolytique sur certaines protéines menant à l'apoptose. Elles vont notamment cliver, et donc inhiber, les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (PARP, Rad51, DNA-PK), la régulation du cycle cellulaire (pRb, Mdm2), la structure cellulaire (actine, β -caténine, etc) et certaines voies de signalisation (MEKK1, Bcl-2, Bcl-X_L, etc) (pour revue, Alenzi *et al.*, 2010).

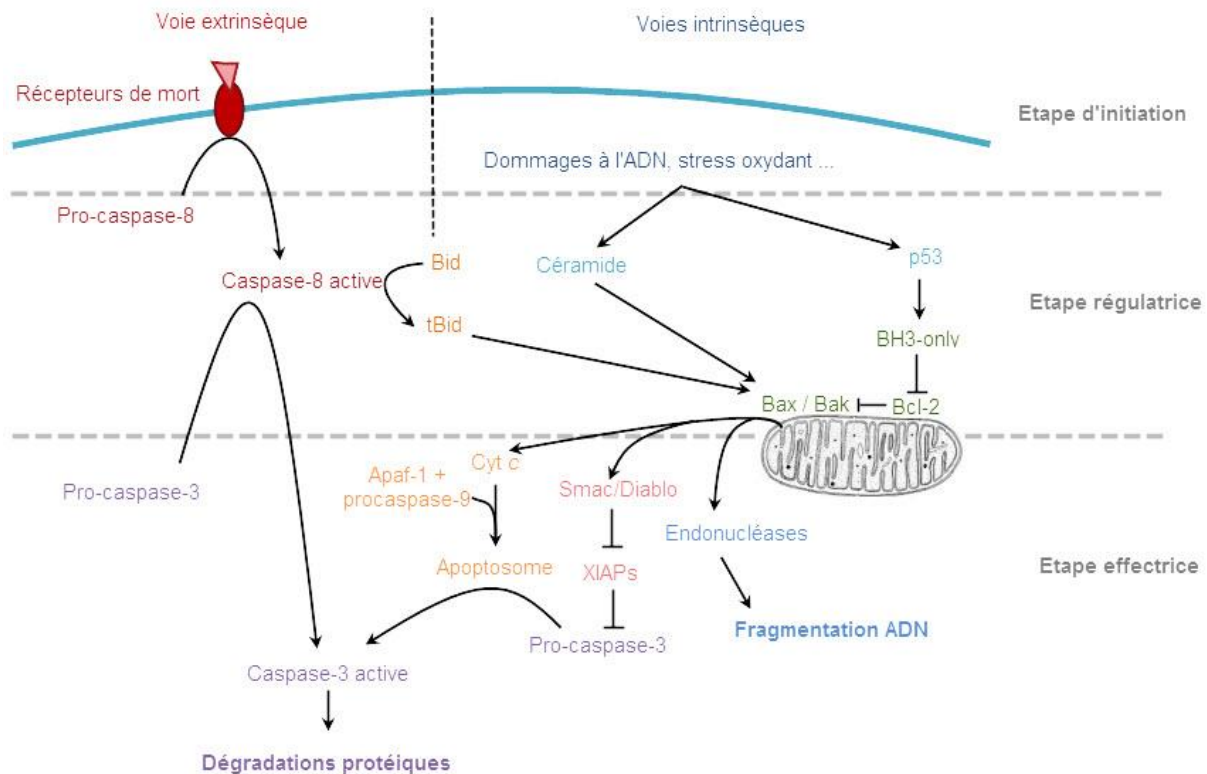


Figure 17 : Différentes étapes de l'apoptose.

4.6.2. Voie intrinsèque p53-dépendante

La voie intrinsèque p53-dépendante est initiée par la détection d'un « défaut » cellulaire, comme des dommages à l'ADN non réparables, une augmentation du stress oxydant, etc. Lors de l'initiation de l'apoptose, les systèmes « détecteurs » vont activer la protéine p53. Celle-ci, en plus d'avoir un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire, peut aussi activer l'expression de différents gènes impliqués dans l'apoptose. Parmi ces gènes, on en retrouve qui codent pour des protéines impliquées dans la machinerie apoptotique, comme APAF-1 (Robles *et al.*, 2001), ce qui ne permet pas d'initier l'apoptose mais contribue à la potentialiser. La protéine p53 active également la transcription de protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, comme Bax (voir partie IV.1.2.), qui va agir directement en formant un pore dans la MEM, mais aussi comme des protéines « BH3-only » (PUMA, Noxa ; voir partie IV.1.3.) (Nakano & Vousden, 2001 ; Oda *et al.*, 2000), qui vont initier l'apoptose.

Ceci a pour conséquences d'activer les protéines pro-apoptotiques multi-domaines de la famille Bcl-2 (voir partie IV.2.), Bax et Bak, qui vont se dimériser au niveau de la MEM pour former un pore (Zha *et al.*, 1996 ; Dewson *et al.*, 2008).

4.6.3. Voie intrinsèque p53-indépendante

La voie intrinsèque p53-indépendante fait intervenir une signalisation membranaire conduisant à la formation d'un médiateur lipidique, le céramide (Cer), qui agit alors sur un grand nombre de voies de signalisation favorisant l'induction de l'apoptose (Pettus *et al.*, 2002).

➤ Métabolisme du céramide

Le Cer peut être synthétisé selon deux voies métaboliques : la biosynthèse *de novo* ou par hydrolyse de la sphingomyéline membranaire (SM) (Figure 18). La **biosynthèse *de novo*** se fait au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et débute par la condensation de la L-sérine avec le palmitoyl-CoA (Coenzyme A) grâce à la Sérine Palmitoyl Transférase (SPT) pour former la 3-kétosphinganine. Celle-ci est ensuite réduite en sphinganine par la kétosphinganine réductase, puis la dihydroceramide synthase ajoute un acide gras pour former le dihydroceramide. Enfin, une désaturase permet la formation de Cer (Figure 18).

D'autre part, le Cer peut être synthétisé après hydrolyse de la SM grâce aux **Sphingomyélinases** (SMases). Il existe deux classes de SMases : les SMases acides, dont le pH optimal enzymatique est de 4,5 et les SMases neutres, dont le pH optimal d'activité est de 7,4.

Le Cer peut ensuite être transformé *via* des voies différentes (Figure 18). La voie de la **sphingosine-1-phosphate** commence par l'hydrolyse du céramide en sphingosine et un acide gras sous l'action de la céramidase (réaction réversible par la Céramide Synthase (CerS)). Cette sphingosine est ensuite phosphorylée par la sphingosine kinase en sphingosine-1-phosphate, qui joue également un rôle dans l'apoptose (pour revue, Reynolds *et al.*, 2004). Le Cer peut également être phosphorylé directement par une **céramide kinase** pour former un céramide-1-phosphate. Enfin, le Cer peut être glycosylé par une **glucosylcéramide synthase** pour former des glucosylcéramides, précurseurs des glycolipides et des gangliosides.

Figure 18 : Métabolisme du céramide (d'après Reynolds *et al.*, 2004).

➤ Production de céramide en réponse à l'irradiation

A l'état basal, la synthèse de Cer a lieu dans le RE et permet la synthèse de sphingolipides plus complexes (Mandon *et al.*, 1992). Après irradiation, la CerS mitochondriale est activée et produit du Cer spécifiquement à la mitochondrie sans modifier son métabolisme endoplasmique (Liao *et al.*, 1999). Alors que la CerS2 induit la protection des cellules vis-à-vis des irradiation ionisantes, l'activité des CerS5 et CerS6 induit la translocation de Bax à la mitochondrie pour former le pore dans la MEM menant à l'apoptose (Mesicek *et al.*, 2010).

La production de Cer est essentielle pour l'induction de l'apoptose radio-induite précoce, mais également lors de l'apoptose tardive qui est activée après la catastrophe mitotique (Alphonse *et al.*, 2013). Dans une lignée radiosensible, Ardail *et al.* (2009), ont montré que la production de Cer avant 48h provient de l'hydrolyse de la SM endogène, alors que le Cer tardif produit 48h après irradiation est synthétisé selon la voie *de novo*.

La radorésistance de certaines cellules tumorales peut venir soit d'une déficience en SMase acide (Santana *et al.*, 1996), soit en une augmentation de l'expression de la céramidase acide lysosomale, ce qui prévient la formation de Cer en réponse à l'irradiation (Mahdy *et al.*, 2009) et augmente la production de sphingosine-1-phosphate qui est anti-apoptotique (Beckham *et al.*, 2012).

5. Effets cellulaires des rayonnements ionisants

5.1. Survie cellulaire

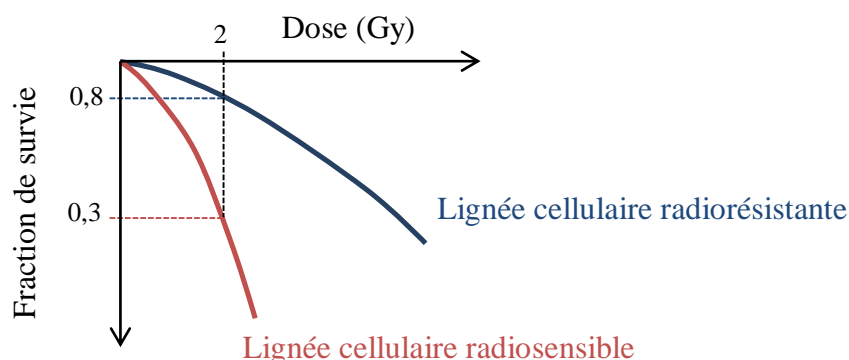


Figure 19 : Exemples de courbes de survie de deux lignées cellulaires.

Dans cet exemple, la lignée cellulaire radiorésistante possède une fraction de survie à 2 Gy (SF2) de 0,8 ; la lignée cellulaire radiosensible possède une SF2 de 0,3.

En raison des effets biologiques des radiations ionisantes, la proportion des cellules vivantes, et donc capables de se diviser, va diminuer au fur et à mesure que la dose augmente. La courbe de survie permet de représenter graphiquement ces effets. Dans le cas d'une irradiation par photons, les courbes de survie présentent un épaulement en début de courbe et une fin non mono-exponentielle (Figure 19). La survie est donc décrite par l'équation :

$$S = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$$

où S représente la survie, D représente la dose délivrée et les coefficients α et β représentent respectivement les lésions létales non réparables et les lésions sub-létales. La fraction de survie à 2 Gy (SF2) est un paramètre très souvent utilisé en radiobiologie pour déterminer et comparer les radiosensibilités de différentes lignées cellulaires. Ce paramètre correspond à la proportion de cellules capables de se diviser après une irradiation à 2 Gy.

5.2.Efficacité biologique relative

L'Efficacité Biologique Relative (EBR) permet de comparer les effets des rayonnements ou des faisceaux d'énergies ou de natures différentes, par exemple la comparaison de photons et d'ions carbone, sur un type de cellules données. L'EBR correspond donc au rapport entre les doses d'un rayonnement de référence et du rayonnement étudié qui induisent le même effet, la même survie cellulaire (Figure 20). La formule de calcul est la suivante :

$$EBR = D_{\text{référence}} / D_{\text{comparé}}$$

où $D_{\text{référence}}$ est la dose du rayonnement de référence (généralement les photons) pour avoir une survie donnée (par exemple 10%) et $D_{\text{comparé}}$ est la dose du rayonnement à comparer (ions carbone, protons...) pour avoir la même survie.

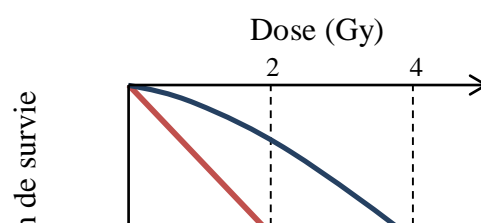


Figure 20 : Exemple de calcul d'EBR pour une même lignée sur deux faisceaux différents.

Cette lignée présente une survie de 10% à 2 Gy lorsqu'elle est irradiée en carbone, et 4 Gy lorsqu'elle est irradiée en photons. Le calcul de l'EBR du faisceau carbone par rapport au rayonnement photon est le suivant : $EBR = 4/2 = 2$.

Chapitre IV - La famille Bcl-2

Depuis plusieurs années, des études génétiques et biochimiques ont révélé l'existence d'un grand nombre d'acteurs impliqués dans la mort par l'apoptose, acteurs qui sont particulièrement bien conservés tout au long de l'évolution. Tout d'abord, il existe chez les invertébrés, et plus particulièrement chez *Ceanorhabditis elegans*, 4 protéines appartenant à la « machinerie » apoptotique : trois protéines pro-apoptotiques (CED-3, CED-4 et EGL-1) et une protéine anti-apoptotique (CED-9) (pour revue, Igaki & Miura, 2004). Des analogues de ces protéines ont été découverts chez les mammifères : CED-3 est relié à la famille des caspases ; CED-4 est un analogue de l'adaptateur Apaf-1 ; enfin, CED-9 et EGL-1 ont des structures et des fonctions similaires aux protéines de la famille Bcl-2. Chez l'Homme, la protéine Bcl-2 (*B Cell Lymphoma-2*) a été découverte en 1986 chez un patient atteint d'un lymphome B pour qui le gène *BCL2* avait subi une translocation t (14;18) (Cleary *et al.*, 1986). Cette translocation met le gène *BCL2* sous le contrôle du promoteur fort du gène des immunoglobulines et a pour conséquence une surexpression de Bcl-2, facilitant ainsi le développement ou la prolifération des cellules cancéreuses. Par la suite, de nombreuses protéines ayant les mêmes caractéristiques structurales ont été découvertes chez les eucaryotes supérieurs (pour revue, Lanave *et al.*, 2004) et ont ainsi été classées dans la « famille Bcl-2 ».

1. Classification des protéines de la famille Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 sont caractérisées par une structure comprenant 4 domaines d'homologie appelés domaines BH (*Bcl-2 homology domain*), domaines qui sont des séquences courtes de moins de 20 résidus d'acides aminés (Yin *et al.*, 1994 ; Chittenden *et al.*, 1995 ; Zha *et al.*, 1996). Les protéines de la famille Bcl-2 interviennent dans l'apoptose, notamment au cours de la libération du cytochrome c dans le cytosol : certaines protéines de cette famille sont pro-apoptotiques car elles favorisent la libération du cytochrome c dans le cytosol alors que d'autres sont anti-apoptotiques (Figure 21).

Figure 21 : Schéma simplifié de l'action des protéines anti-apoptotiques et proapoptotiques de la famille Bcl-2 lors de l'apoptose (d'après Rautureau *et al.*, 2010).

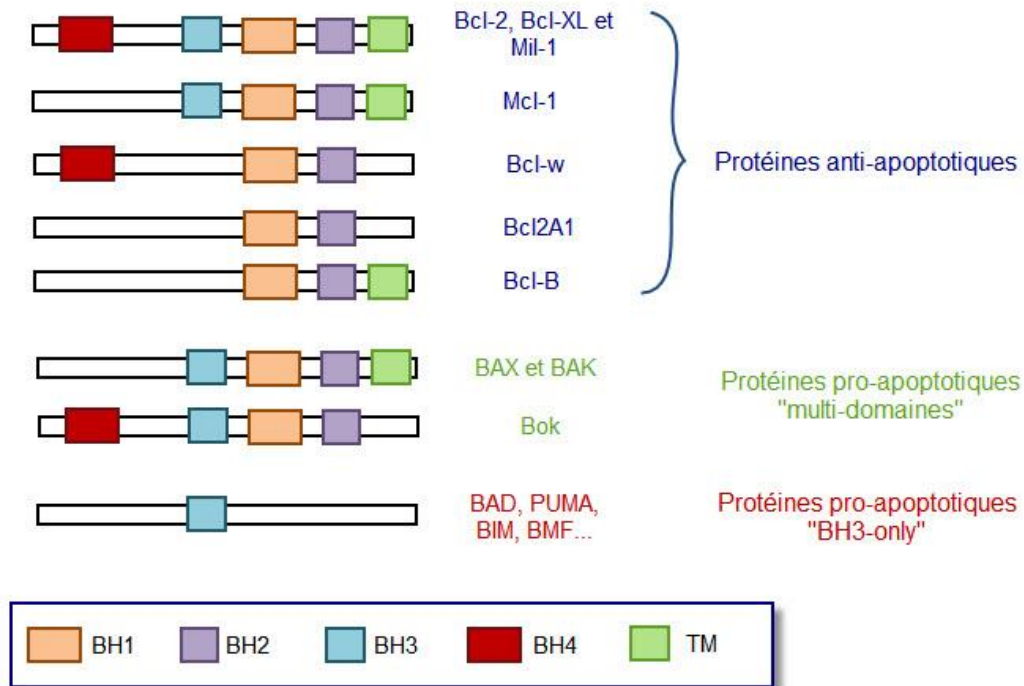


Figure 22 : Structure des protéines de la famille Bcl-2.

BH : domaine *Bcl-2* homology ; TM : domaine transmembranaire.

Ces deux caractéristiques permettent de classer ces protéines en 3 sous-familles (Figure 22) :

- Les protéines **anti-apoptotiques**, pouvant présenter des homologies pour les 4 domaines BH ;
- Les protéines **pro-apoptotiques multi-domaines** possédant plusieurs domaines BH ;
- Les protéines **pro-apoptotiques dites « BH3 only »**, ne possédant que le domaine BH3.

1.1. Les protéines anti-apoptotiques

Les protéines anti-apoptotiques peuvent présenter de 2 à 4 domaines BH et sont généralement situées dans la membrane externe mitochondriale, et plus rarement dans le cytosol ou dans la membrane du réticulum endoplasmique. Cette sous-famille est composée des protéines Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-W, Bcl2A1 et Bcl-B.

1.1.1. Structures, localisations et régulations

➤ Bcl-2

La protéine anti-apoptotique Bcl-2 (239 résidus d'acides aminés, 26 266 Da) est surexprimée dans un grand nombre de cancers solides, dont les cancers des VADS (Sharma *et al.*, 2004), mais également dans les leucémies (Campos *et al.*, 1993) et les lymphomes (Gaulard *et al.*, 1992).

Elle est composée des quatre domaines BH et d'un domaine transmembranaire du côté C-terminal qui permet sa localisation dans les membranes externes mitochondriales (MEM), l'enveloppe nucléaire (EN) et dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) (Krajewski *et al.*, 1993). Sa structure secondaire est conservée entre les différentes protéines anti-apoptotiques et comprend huit hélices- α connectées par des boucles : les hélices 5 et 6 forment le centre de la protéine et sont majoritairement hydrophobes ; ces deux hélices sont entourées par d'autres hélices- α , les hélices 1 et 2 d'un côté et les hélices 3 et 4 de l'autre côté (Petros *et al.*, 2001). De plus, les hélices 3, 4, 5 et 6 forment une poche hydrophobe importante pour ses interactions avec les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Petros *et al.*, 2001). Enfin, Bcl-2 possède également une boucle non-structurée qui a un rôle dans ses modifications post-traductionnelles.

En effet, Bcl-2 peut être phosphorylée au niveau de différents résidus (thréonine 69, sérines 70 et 87) localisés dans cette région non-structurée. Ces phosphorylations ont des conséquences variables selon le type cellulaire considéré et les stimuli cellulaires : elles peuvent induire une inactivation de la protéine et une entrée en apoptose (Haldar *et al.*, 1998 ; Yamamoto *et al.*, 1999) ou bien une stabilisation de la protéine et de son interaction avec Bax, renforçant ainsi sa propriété anti-apoptotique (Ruvolo *et al.*, 2002 ; Low *et al.*, 2014). Enfin, la phosphorylation de Bcl-2 permet également de réguler l'homéostasie calcique (Bassik *et al.*, 2004) et l'autophagie (Wei *et al.*, 2008).

Le niveau d'expression de la protéine Bcl-2 est également régulé au niveau post-transcriptionnel grâce à différents micro-ARN (miARN) comme les miARN-15 et miARN-16 (Cimmino *et al.*, 2005), miARN-129 (Karaayvaz *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2014a), miRNA-30b (Liao *et al.*, 2014) etc.

➤ Bcl-X_L

Un épissage alternatif du gène *BCLX* permet la synthèse de deux isoformes : l'isoforme Bcl-X_L d'une part (233 résidus, 26 049 Da) qui est anti-apoptotique et qui est exprimée dans un grand nombre de tissus et Bcl-X_S d'autre part (170 résidus, 18 894 Da) à qui il manque les domaines BH1 et BH2, qui est pro-apoptotique et qui est exprimée dans les cellules ayant un taux de renouvellement important (Boise *et al.*, 1993). D'un point de vue structural, Bcl-X_L est très proche de Bcl-2, avec quatre domaines BH et un domaine transmembranaire qui lui permet d'être localisée dans la MEM et le RE (Fiebig *et al.*, 2006). Au niveau de sa structure tertiaire, Bcl-X_L possède également une poche hydrophobe, qui permet les interactions avec d'autres protéines de la famille Bcl-2, ainsi qu'une boucle non-structurée (Muchmore *et al.*, 1996).

Cette boucle non-structurée peut être phosphorylée au niveau du résidu sérine 62 (Basu & Haldar, 2003), entraînant une poly-ubiquitinylation suivie d'une dégradation de la protéine (Kajihara *et al.*, 2014). En réponse à un stress oxydant, Bcl-X_L peut aussi être phosphorylée par Mst1 au niveau du résidu sérine 14 qui est localisé dans le domaine BH4 (Del Re *et al.*, 2014). Cette phosphorylation a pour conséquence de libérer la protéine pro-apoptotique Bax et d'induire l'entrée de la cellule en apoptose.

Au niveau post-transcriptionnel, l'ARNm de *BCLX* est régulé par les miARN-491-5p (Guo *et al.*, 2012), miARN-133a (Ji *et al.*, 2013) et miARN-98 (Xiang *et al.*, 2013 ; Xia *et al.*, 2014).

Bcl-X_L est surexprimée dans différents cancers solides, dont les cancers des VADS (Sharma *et al.*, 2004).

➤ Mcl-1_L

La protéine Mcl-1_L (350 résidus, 37 337 Da) possède un domaine transmembranaire du côté C-terminal, ainsi que trois domaines BH (BH1, BH2 et BH3). De plus, cette protéine possède une séquence PEST, riche en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et tyrosine (T), séquence qui intervient dans la régulation post-traductionnelle de la protéine et dans sa dégradation par le protéasome. Enfin, Mcl-1_L possède un domaine transmembranaire lui permettant de s'ancrer dans les différentes membranes subcellulaires.

Le promoteur du gène *MCL1* contient des sites de fixation pour différents facteurs de transcription (Akgul *et al.*, 2000), la transcription pouvant être activée soit constitutivement,

soit en réponse à différents stimuli externes comme des facteurs de croissance tels que l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) (Booy *et al.*, 2011) ou le VEGF (Le Gouill *et al.*, 2004) ou bien des cytokines (Puthier *et al.*, 1999 ; Huang *et al.*, 2000). Ces signaux extracellulaires vont activer différentes voies de signalisation intracellulaires, telles que la voie des MAPK (Booy *et al.*, 2011), la voie STAT3 (Puthier *et al.*, 1999), la voie ERK1/2 (Goncharenko-Khaider *et al.*, 2012) ou la voie PI3K/Akt (Huang *et al.*, 2000), responsables de l'activation de la transcription de *MCL1*. *MCL1* est également inhibé directement par E2F1 (Croxtton *et al.*, 2002) et par p53 (Pietrzak & Puzianowska-Kuznicka, 2008), ce qui diminue sa transcription en réponse à des stimuli pro-apoptotiques (Iglesias-Serret *et al.*, 2003).

Comme pour Bcl-X_L, il existe, au niveau post-transcriptionnel, plusieurs variants correspondants à des épissages alternatifs différents. Un épissage alternatif avec perte de l'exon 2 permet la synthèse de Mcl-1_S (*short*, 271 résidus, 28 662 Da) qui ne contient que le domaine BH3 et qui, contrairement à Mcl-1_L, a une activité pro-apoptotique (Bae *et al.*, 2000). Un autre épissage alternatif concernant l'exon 1 permet la synthèse du variant pro-apoptotique Mcl-1_{ES} (*extra-short*, 197 résidus, 21 261 Da) qui possède les trois domaines BH (Kim *et al.*, 2009a). Ce variant se lie uniquement à Mcl-1_L et à aucune autre protéine anti-apoptotique de la famille Bcl-2, et induit l'apoptose sans passer par l'oligomérisation de Bax et Bak (Kim & Bae, 2013). Enfin, un quatrième variant, appelé Mcl-1_{L(JAM)}, a également été récemment découvert comme étant une protéine anti-apoptotique (Hagenbuchner *et al.*, 2013). Ce variant a une partie de la séquence PEST qui est tronquée, empêchant certaines modifications post-traductionnelles, modifiant de ce fait sa dégradation et sa stabilité. De plus, la stabilité de l'ARNm de Mcl-1 est régulée par l'expression de différents miARN, comme les miRNA-101 (Konno *et al.*, 2014 ; Lam *et al.*, 2010), miARN-29b (Sugio *et al.*, 2014 ; Lam *et al.*, 2010), mi-ARN-153 (Xu *et al.*, 2011 ; Lam *et al.*, 2010) etc.

La protéine Mcl-1_L peut être régulée au niveau post-traductionnel *via* sa séquence PEST. Tout d'abord, cette protéine peut être clivée au niveau des résidus aspartates 127 et 157 par les caspases (Michels *et al.*, 2004) et par le granzyme B (Han *et al.*, 2005), provoquant la formation d'une forme tronquée de la protéine, pro-apoptotique (Michels *et al.*, 2004) et/ou entraînant une libération de la protéine pro-apoptotique Bim (Han *et al.*, 2005). Mcl-1_L peut également être poly-ubiquitinylée au niveau de 5 résidus sérine différents grâce à la Mcl-1 Ubiquitin Ligase E3 (MULE) et être dégradée au niveau du protéasome (Zhong *et al.*, 2005). Cependant l'ubiquitinylation de Mcl-1_L est réversible grâce à la protéine USP9X (*Ubiquitin Specific Peptidase 9 X-linked*) (Schwickart *et al.*, 2010). Cette enzyme clive la chaîne poly-ubiquitine,

rendant la protéine plus stable et permettant aux cellules de résister à l'entrée en apoptose. Certains agents chimio-thérapeutiques, comme le Taxol, la Vincristine ou la Doxorubicine, peuvent augmenter l'ubiquitinylation de Mcl-1 et diminuer ainsi son expression afin d'induire l'apoptose (Wertz *et al.*, 2011 ; Hao *et al.*, 2012a).

Dans cette région PEST, plusieurs résidus peuvent être phosphorylés, et ce, avec des conséquences très diverses. Ainsi, la phosphorylation de la sérine 64 par CDK1, CDK2 ou JNK1 au cours de la phase G2/M du cycle cellulaire augmente l'affinité de Mcl-1_L pour les protéines pro-apoptotiques (Bim, Noxa, Bak) et donc la résistance cellulaire à l'apoptose (Kobayashi *et al.*, 2007). Ding *et al.* (2008) ont par ailleurs montré que la phosphorylation du résidu thréonine 92, associée à la phosphorylation de la thréonine 163 induit une stabilisation de la protéine. En revanche, après un stress induisant un arrêt en phase M, il y a phosphorylation du résidu thréonine 92 par la CDK1 avec pour conséquence une dégradation de Mcl-1_L (Harley *et al.*, 2010). La sérine 121 peut également être phosphorylée, en association avec la thréonine 163, mais des résultats contradictoires sur sa stabilité ont été montrés (Inoshita *et al.*, 2002 ; Kodama *et al.*, 2009). Enfin, Mcl-1_L peut être phosphorylée sur le résidu sérine 159 par la Glycogen Synthase Kinase (GSK-3), ce qui entraîne l'ubiquitinylation de la protéine par l'E3 ubiquitine ligase, β -TrCP, suivie de sa dégradation (Ding *et al.*, 2007).

➤ Bcl2A1/Bfl-1

La protéine Bcl2A1 (175 résidus, 20 132 Da), appelée également Bfl-1 (*Bcl-2 related gene expressed in fetal liver*) est préférentiellement exprimée dans les cellules hématopoïétiques et surexprimée dans certains cancers (Choi *et al.*, 1995) comme les leucémies et les lymphomes (Morales *et al.*, 2005), mais également dans différentes tumeurs solides comme les cancers de l'estomac et du colon (Park *et al.*, 1997), du sein (Yoon *et al.*, 2003), le carcinome hépatocellulaire (Lee *et al.*, 2009), le mélanome (Riker *et al.*, 2008) et les carcinomes épidermoïdes de la peau (Kathpalia *et al.*, 2006) et oraux (Saleh *et al.*, 2010). Dans certains de ces cancers, il a été montré que cette surexpression est corrélée avec un stade avancé, voire métastatique de la maladie (Morales *et al.*, 2005 ; Riker *et al.*, 2008) et retrouvée dans les cellules souches issues de carcinomes épidermoïdes oraux (Yajima *et al.*, 2009).

Bcl2A1 est composée des quatre domaines BH (Choi *et al.*, 1995), ainsi que d'une hélice amphiphile du côté C-terminal, permettant sa localisation dans la MEM (Brien *et al.*, 2009). Les neuf hélices α qui la composent forment une poche hydrophobe similaire à celles retrouvées

dans les autres protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et lui permet d'interagir avec les domaines BH3 des autres protéines cette famille (Herman *et al.*, 2008).

L'expression de Bcl2A1 est régulée au niveau transcriptionnel et post-traductionnel. Au niveau transcriptionnel, le gène *BCL2A1* est principalement activé par NFκB, notamment en réponse au TNFα (Zong *et al.*, 1999), à l'hyperoxie (He *et al.*, 2005), au peroxyde d'hydrogène (Kim *et al.*, 2005) ainsi qu'en réponse à l'activation de différents récepteurs tels que le CD40 (Kater *et al.*, 2004) et l'ICAM-1 (Morgan *et al.*, 2004). De plus, d'autres facteurs de transcription peuvent activer la transcription de *BCL2A1* comme l'acide rétinoïque (Liu *et al.*, 2000) et ses agonistes (Rasooly *et al.*, 2005), Spi-1/PU.1 (Jenal *et al.*, 2010) et WT-1 (Simpson *et al.*, 2006). Après sa transcription, un épissage alternatif permet la synthèse d'une protéine tronquée appelée Bfl-1S (Ko *et al.*, 2003) qui est également anti-apoptotique, contrairement aux épissages alternatifs de Bcl-X et Mcl-1, et qui est localisée préférentiellement au niveau nucléaire. Au niveau post-traductionnel, la protéine Bcl2A1 a une demi-vie courte car elle peut être ubiquitinylée pour être dégradée dans le protéasome (Kucharczak *et al.*, 2005).

Enfin, Bcl2A1 possède un profil d'interactions proche de celui de Mcl-1_L. En effet, il a été montré que Bcl2A1 se lie aux protéines pro-apoptotiques Bim, Puma, Bid (Chen *et al.*, 2005) ainsi qu'à sa forme activée tBid (Simmons *et al.*, 2008) et plus faiblement à Hrk ou Noxa (Chen *et al.*, 2005). Concernant les interactions avec Bax et Bak, des résultats contradictoires ont été publiés : en système cellulaire, certaines études ont montré une interaction préférentielle avec Bak plutôt qu'avec Bax (Simmons *et al.*, 2008) alors que d'autres études ont montré une absence d'interaction (Willis *et al.*, 2005) ou bien une interaction avec les deux protéines (Ku *et al.*, 2011). Enfin, Bcl2A1 interagit également avec Beclin-1 afin d'inhiber l'autophagie (Kathania *et al.*, 2011).

➤ Bcl-W

Bcl-W est exprimée dans un grand nombre de tissus (cerveau, colon, cellules hématopoïétiques etc) (O'Reilly *et al.*, 2001), mais semble surtout indispensable lors de la spermatogénèse (Print *et al.*, 1998). Son expression dans différents cancers (O'Reilly *et al.*, 2001) est également associée à des propriétés invasives de la tumeur (Lee *et al.*, 2003) et au phénotype de cellules souches (Bae *et al.*, 2014).

La protéine Bcl-W (193 résidus, 20 746 Da) est composée des domaines BH1, BH2 et BH4 mais ne comporte pas de domaine transmembranaire. Cependant, cette protéine est

localisée au niveau de la MEM, de l'EN et du RE (O'Reilly *et al.*, 2001). Au niveau de sa structure tertiaire, Bcl-W possède une poche hydrophobe commune aux protéines anti-apoptotiques mais sa particularité réside dans le fait qu'elle possède une neuvième hélice- α dont la présence est très importante pour la structure tertiaire de la protéine (Schilling *et al.*, 2014) comme l'ont montré certaines études utilisant des protéines Bcl-W plus ou moins tronquées au niveau de cette hélice- α 9 (Schilling *et al.*, 2014).

Le promoteur du gène *BCLW* contient un motif de liaison pour les facteurs de transcription TCF/LEF et peut ainsi être activé par la β -caténine (Lapham *et al.*, 2004) et par NF κ B (Tran *et al.*, 2005). L'expression de Bcl-W peut aussi être modulée au niveau post-transcriptionnel *via* différents miARN, tels que les miARN-205 (Bhatnagar *et al.*, 2010), miARN-122 (Ma *et al.*, 2014) ou miARN-195 (Yang *et al.*, 2012a).

➤ Bcl-B

Bcl-B (194 résidus, 21 973 Da) est exprimée préférentiellement dans le foie, le cerveau, le pancréas, les poumons et les reins (Ke *et al.*, 2001 ; Aouacheria *et al.*, 2001). Sa surexpression dans les cancers du sein, de la prostate et colorectaux est associée à un mauvais pronostic (Krajewska *et al.*, 2008). En revanche, son expression dans des cancers gastriques est plutôt corrélée à une meilleure évolution de la maladie (Krajewska *et al.*, 2008). Au niveau structural, la protéine Bcl-B possède les quatre domaines BH ainsi que le domaine transmembranaire, ce qui lui permet d'être localisée dans la MEM (Ke *et al.*, 2001 ; Aouacheria *et al.*, 2001).

La protéine Bcl-B peut être ubiquitinylée (van de Kooij *et al.*, 2013), modification post-traductionnelle qui cible la protéine vers le protéasome pour être dégradée, sensibilisant de ce fait les cellules à divers agents chimiothérapeutiques comme l'ABT-737, la Roscovitine, l'Etoposide, la Vincristine ou le ligand TRAIL (van de Kooij *et al.*, 2013). De plus, certains de ces agents (Roscovitine, Etoposide et Vincristine) diminuent en retour l'expression de Bcl-B, comme pour Mcl-1.

1.1.2. Fonctions des protéines anti-apoptotiques

➤ Régulation de l'apoptose mitochondriale

	Bax	Bak
<i>Bcl-2</i>	X	
<i>Bcl-X_L</i>	X	X
<i>Mcl-1</i>	X	X
<i>Bcl2A1/Bfl-1</i>	X	X
<i>Bcl-W</i>	X	
<i>Bcl-B</i>	X	

Tableau 4 : Interactions des protéines anti-apoptotiques avec les protéines pro-apoptotiques effectrices (Willis *et al.*, 2005 ; Ku *et al.*, 2011).

Le rôle le plus étudié des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 concerne leur implication dans la mort cellulaire programmée par inhibition directe des protéines effectrices pro-apoptotiques, Bax et Bak (Huang *et al.*, 1998). En effet, les six protéines anti-apoptotiques interagissent avec Bax et/ou Bak (Tableau 4), les empêchant de s'insérer dans la MEM. De plus, elles interagissent également avec les protéines pro-apoptotiques BH3-only (Tableau 5) ce qui leur permet de contrôler la perméabilité de la MEM et la libération dans le cytosol des facteurs pro-apoptotiques tel que le cytochrome c (voir partie III.4.6.).

	tBid	Bim	Bad	Bmf	Bik	Hrk	Puma	Noxa
<i>Bcl-2</i>	X	X	X	X	X	X	X	
<i>Bcl-X_L</i>	X	X	X	X	X	X	X	
<i>Mcl-1</i>	X	X		X			X	X
<i>Bcl2A1</i>	X	X					X	
<i>Bcl-W</i>	X	X	X	X	X		X	
<i>Bcl-B</i>		X						

Tableau 5 : Interactions des protéines anti-apoptotiques avec les protéines BH3-only (Chen *et al.*, 2005 ; Rautureau *et al.*, 2012 ; Del Gaizo Moore & Letai, 2013).

➤ Régulation du cycle cellulaire

A l'origine, la protéine Bcl-2 a été décrite comme un oncogène favorisant la carcinogénèse en augmentant la survie cellulaire. Cependant, Bcl-2 présente également une

activité anti-proliférative dans différents modèles animaux. Dans ces cas-là, Bcl-2 inhibe dans un premier temps la prolifération, caractéristique qui est ensuite perdue lorsque la tumeur progresse vers l'hyperplasie et l'adénocarcinome (Furth *et al.*, 1999 ; Murphy *et al.*, 1999). Ceci vient du fait que Bcl-2 peut retarder l'entrée en phase S à partir de la phase G0/G1 dans le cycle cellulaire. En effet, la surexpression de Bcl-2 augmente l'expression de l'inhibiteur de CDK, p27KIP1, et de p130, maintenant le complexe répresseur E2F4/p130 dans un état stable (Vairo *et al.*, 2000) ce qui entraîne un retard de l'expression de la cycline E, nécessaire au passage de la phase G0/G1 à la phase S (Vail *et al.*, 2002).

Dans certaines conditions, comme la diminution de l'apport en nutriments, la protéine Bcl-X_L possède également un rôle anti-prolifératif, en prolongeant l'arrêt en phase G0/G1 et en retardant l'entrée en phase S (Janumyan *et al.*, 2003). De plus, pendant un arrêt en phase G2 induit par des dommages à l'ADN, Bcl-X_L est phosphorylée au niveau du résidu sérine 62 et localisée au niveau nucléaire. Cette phosphorylation permet la stabilisation de Cdk1/Cdc2 dans le noyau afin d'empêcher l'entrée en mitose (Wang *et al.*, 2012a). De plus, cette phosphorylation de Bcl-X_L au niveau du résidu sérine 62 module la formation du fuseau mitotique et la séparation des chromosomes au cours de la mitose (Wang *et al.*, 2014).

➤ Régulation de l'apoptose céramide-dépendante

La protéine Bcl-2 est également impliquée dans le métabolisme du céramide et donc dans l'apoptose céramide-dépendante. En effet, la surexpression de Bcl-2 permet de bloquer la formation de céramide après stimulation des cellules par le TNF- α ou après traitement par l'Etoposide ou au Cisplatine, empêchant de ce fait la libération du cytochrome c et l'activation des caspases (Sawada *et al.*, 2000). La surexpression de Bcl-2 entraîne également une augmentation de l'expression et de l'activité de la sphingosine kinase de type 1, ce qui a pour conséquence d'augmenter la production de sphingosine-1-phosphate et de favoriser la survie cellulaire (Bektas *et al.*, 2005).

Bcl-X_L possède également un rôle dans l'apoptose céramide-dépendante en déstabilisant les canaux céramides formés dans la MEM (Siskind *et al.*, 2008). Au niveau moléculaire, la poche hydrophobe de Bcl-X_L interagit avec la chaîne apolaire d'un des céramides formant le canal membranaire (Perera *et al.*, 2012). Cette interaction va alors déplacer l'interface entre les phospholipides membranaires et les céramides et provoquer la déstabilisation structurale du canal, menant à son désassemblage (Perera *et al.*, 2012).

➤ Régulation de la signalisation calcique

Les protéines anti-apoptotiques jouent également un rôle dans la régulation des échanges de calcium entre la mitochondrie et le RE. Ces deux organites sont étroitement connectés sur certaines zones de leurs membranes grâce à des protéines spécifiques (Mitufusin2, Mdm10, Mdm12...) (pour revue, Grimm, 2011). Ces zones de contact sont appelées « membranes associées aux mitochondries » (MAM, *Mitochondria Associated Membranes*) (Vance, 1990) et contiennent, entre autres, des protéines permettant le transfert de calcium d'un organite à l'autre (Grimm, 2011) : c'est le cas du récepteur à l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃R, *inositol-1,4,5-triphosphate receptor*), localisé au niveau du RE qui est connecté au VDAC (*Voltage Dependent-Anion-Channel*) mitochondrial par l'intermédiaire de la protéine Grp75 (*Glucose Regulating Protein 75*) (Szabadkai *et al.*, 2006). A l'état basal, la concentration calcique dans le RE est très élevée (de l'ordre de 100 à 500 µM) comparativement à la concentration cytosolique ou mitochondriale (10 à 100 nM). Dans ces conditions, le flux calcique entre les deux organites suit des oscillations constantes mais de faible amplitude : il y a la sortie du calcium du RE vers la MAM par l'intermédiaire de l'IP₃R, puis entrée dans la mitochondrie *via* le VDAC (Grimm, 2011). Après un stress (C2-céramide, H₂O₂, acide arachidonique), la libération massive et/ou prolongée du calcium endoplasmique vers la mitochondrie mène à l'apoptose (Grimm, 2011).

La protéine Bcl-2 est capable d'inhiber le transfert du calcium à partir du RE vers la mitochondrie et donc d'inhiber l'apoptose en réponse à différents stimuli (Distelhorst *et al.*, 1996 ; Pinton *et al.*, 2001). Pour expliquer ce phénomène, différentes hypothèses ont été formulées : soit Bcl-2 interagit directement en inhibant les IP₃R (Chen *et al.*, 2004) ; soit Bcl-2 diminue la concentration calcique endoplasmique (Pinton *et al.*, 2000) ; soit Bcl-2 modifie la phosphorylation des IP₃R et donc les inactive (Chang *et al.*, 2014).

Parallèlement, Bcl-X_L intervient également dans la régulation du flux calcique entre le RE et la mitochondrie. En effet, cette protéine est capable de se lier aux extrémités C-terminales des trois isoformes d'IP₃R (Eckenrode *et al.*, 2010). Comme pour Bcl-2, l'interaction entre Bcl-X_L et les IP₃R a pour conséquence un efflux du calcium du RE vers le cytosol ce qui favorise la survie cellulaire (Li *et al.*, 2007). Parallèlement, il a été montré que Bcl-X_L exerce également un rôle au niveau de l'influx calcique dans la mitochondrie (Huang *et al.*, 2013) : par son interaction avec le VDAC au niveau de la MEM, un signal calcique continu vers la matrice

mitochondriale est généré, ce qui est nécessaire au maintien de la bioénergétique cellulaire lors de la survie.

Enfin, Mcl-1 semble également jouer un rôle dans l'échange du calcium entre la mitochondrie et le RE bien que son mode d'action ne soit pas encore bien défini. Selon certains auteurs, Mcl-1 empêche l'entrée du calcium dans la mitochondrie (Minagawa *et al.*, 2005) grâce à l'inhibition de la protéine p32 qui est impliquée dans l'entrée du calcium dans la mitochondrie (Xiao *et al.*, 2014). Cependant, Eckenrode *et al.* (2010) ont montré que Mcl-1 peut également se lier aux IP₃R pour favoriser le flux calcique vers le cytosol et ainsi diminuer le pool de calcium endoplasmique.

➤ Implication dans la réparation de l'ADN

Mcl-1 semble avoir un rôle dans la réparation de l'ADN. Jamil *et al.* (2008) ont tout d'abord montré une localisation nucléaire de la protéine Mcl-1 après induction de dommages à l'ADN (Etoposide ou irradiation UV par exemple) ; Mcl-1 agit alors en combinaison avec ATR (*Ataxia Telangectasia mutated and Rad3 related*) pour phosphoryler Chk1, nécessaire lors de l'arrêt en phase G2 du cycle (Jamil *et al.*, 2008). De plus, Mcl-1 s'associe à NBS1 après apparition de cassures doubles brins de l'ADN et permet la phosphorylation de γ H2AX dans le cadre de la réparation de ces cassures (Jamil *et al.*, 2010).

Bcl-2 pourrait aussi jouer un rôle dans la réparation de l'ADN, plus particulièrement au cours du mécanisme NHEJ, en s'associant aux protéines Ku (Kumar *et al.*, 2010). Cette propriété n'a pour l'instant pas encore été confirmée.

➤ Régulation du système anti-oxydant mitochondrial

La phosphorylation de Bcl-2, que ce soit au niveau de la sérine 70 ou au niveau des résidus thréonine 69 + sérine 70 + sérine 87, permet la régulation des systèmes anti-oxydants cellulaires en favorisant, entre autres, l'expression de la superoxyde dismutase-1 et de la catalase (Deng *et al.*, 2003). De plus, Bcl-2 permet d'augmenter la quantité de glutathion (GSH) intracellulaire (Meredith *et al.*, 1998).

Bcl-2 est également impliquée dans la protection des mitochondries contre le stress oxydant. Le GSH ne peut pas être synthétisé par les mitochondries et doit être importé à partir du cytosol (Ku *et al.*, 1993) grâce à deux transporteurs, le 2-Oxoglutarate Carrier (OGC) et le Dicarboxylate Carrier (DIC) (Chen *et al.*, 2000). Dans ce contexte, Bcl-2 agit comme un

« senseur » du GSH cytosolique grâce à sa poche hydrophobe (Zimmermann *et al.*, 2007). Bcl-2 change alors de conformation et se lie avec l'OGC qui va permettre le transport du GSH vers la matrice mitochondriale (Wilkins *et al.*, 2012). De plus, l'inhibition de Bcl-2, que ce soit avec un inhibiteur stérique ou après une surexpression de Bim, induit une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les mitochondries suivi d'une dépolarisation de la MEM, une fragmentation des mitochondries et une entrée en apoptose (Zimmermann *et al.*, 2007).

Cependant, il a été montré que la surexpression de Bcl-2 est également associée à une augmentation de l'activité de la *Cytochrome c Oxidase* (via la sous-unité COX V dans le complexe IV de la chaîne respiratoire) ce qui par conséquent augmente la production d'anions superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et favorise la survie cellulaire (voir la théorie pro-oxydante de la carcinogénèse partie IV.3.1.). En fait, Bcl-2 facilite l'assemblage des sous-unités COX Va et COX Vb, activant ainsi l'activité de la chaîne respiratoire et par conséquent la production d' $O_2^{\cdot-}$ (Chen & Pervaiz, 2010).

➤ Régulation de l'autophagie

Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W et Bcl-B interagissent et inhibent la protéine Beclin-1 (Erllich *et al.*, 2007 ; Robert *et al.*, 2012), protéine essentielle dans l'autophagie. Beclin-1 possède un motif BH3 qui peut s'insérer dans la poche hydrophobe des protéines anti-apoptotiques (Oberstein *et al.*, 2007), le domaine BH4 de la protéine Bcl-2 étant par exemple impliqué dans l'interaction avec Beclin-1 (Trisciuglio *et al.*, 2013). De plus, il semble que ce type interaction se fasse principalement au niveau du RE et non au niveau de la mitochondrie (Pattingre *et al.*, 2005).

➤ Régulation de l'angiogénèse

La protéine Bcl-2 augmente le pouvoir métastatique de différents cancers (Takaoka *et al.*, 1997 ; Del Bufalo *et al.*, 1997 ; Iervolino *et al.*, 2002) en participant à l'angiogénèse et à l'invasion. Plusieurs études ont été réalisées sur la relation entre l'expression de Bcl-2 et du VEGF. Certaines d'entre elles, réalisées en conditions normoxiques, ont montré que c'est le VEGF qui stimule l'expression de Bcl-2 dans les cellules endothéliales vasculaires (Nör *et al.*, 1999), favorisant ainsi la croissance tumorale (Nör *et al.*, 2001). Quand Bcl-2 est surexprimée dans les cellules endothéliales, il y a activation de la voie NFκB, ce qui provoque une augmentation de l'expression des chimiokines CXCL8 et CXCL1 (Karl *et al.*, 2005). Ces

chimiokines vont alors agir, d'une part, de façon autocrine pour activer l'angiogenèse en agissant sur le récepteur CXCR1 des cellules endothéliales vasculaires (Warner *et al.*, 2008). D'autre part, ces chimiokines vont également activer l'invasion des cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* (Trisciuoglio *et al.*, 2005 ; Warner *et al.*, 2008).

D'autres études, réalisées en hypoxie ont montré que la surexpression de Bcl-2 dans les cellules tumorales augmente l'expression du VEGF (Biroccio *et al.*, 2000 ; Iervolino *et al.*, 2002) en augmentant l'activité du promoteur du gène *VEGF* et en stabilisant son ARNm (Biroccio *et al.*, 2000 ; Iervolino *et al.*, 2002). En fait, le domaine BH4 de Bcl-2, en conditions hypoxiques, interagit avec le facteur de transcription HIF-1 α dans le noyau (Gabellini *et al.*, 2013). Ceci a pour conséquence de stabiliser la protéine HIF-1 α en formant un triplex avec la protéine chaperonne HSP90 (Trisciuoglio *et al.*, 2010) et donc d'activer la transcription des gènes cibles, dont le VEGF.

Parallèlement, la surexpression de Bcl-X_L est également associée à une augmentation de la libération de la chimiokine CXCL8 (Giorgini *et al.*, 2007) et ceci dans plusieurs cancers comme le mélanome, le glioblastome ou les cancers du colon et de la prostate. Ceci se traduit par la prolifération des cellules endothéliales et la formation de vaisseaux (Giorgini *et al.*, 2007).

1.2. Les protéines pro-apoptotiques multi-domaines

Les protéines pro-apoptotiques effectrices de la famille Bcl-2 sont des protéines globulaires possédant plusieurs domaines BH, d'où leur nom, « multi-domaines ». Parmi ces protéines, deux d'entre elles sont très bien connues, à savoir Bax et Bak, alors que la troisième, Bok, est pour l'instant peu étudiée.

1.2.1. Structure et modifications post-traductionnelles

Au niveau structural, Bax et Bak contiennent les quatre domaines BH, ainsi qu'une région transmembranaire ; Bok est également composée des quatre domaines BH mais ne présente pas de région transmembranaire (Figure 22).

➤ Bax

Bax est composé de 7 hélices- α amphiphiles entourant deux hélices centrales, principalement hydrophobes. Les hélices pouvant s'associer à la membrane sont les hélices- α

5, 6 et 9. A l'état basal, l'hélice- α 9 est localisée dans le sillon hydrophobe formé par le reste de la protéine (Suzuki *et al.*, 2000), dont découle sa localisation cytosolique. Après exposition de la cellule à un stress, Bax change de conformation pour être transloquée vers la MEM, le rôle des différentes structures impliquées dans ce phénomène étant encore très controversé. Tout d'abord, l'hélice- α 9 est libérée de la poche hydrophobe (Suzuki *et al.*, 2000) : autant cette séquence semble avoir des propriétés permettant son ancrage transmembranaire (García-Sáez *et al.*, 2004), elle ne permet pas à elle seule la translocation de la protéine (Tremblais *et al.*, 1999). L'hélice- α 9 participe donc à l'insertion de la protéine à la MEM mais avec les hélices- α 5 et 6 (Cartron *et al.*, 2005). De plus, l'extrémité N-terminale est flexible et change également de conformation après un stimulus pro-apoptotique ce qui permet d'exposer l'hélice- α 1 ainsi que les hélices- α 5 et 6. Alors que l'hélice- α 1 semble avoir un rôle dans le ciblage de la protéine vers la mitochondrie (Cartron *et al.*, 2005 ; Brock *et al.*, 2010), d'autres études montrent également l'importance de l'extrémité C-terminale qui pourrait contenir un signal d'adressage mitochondrial (Brock *et al.*, 2010).

Parallèlement, Bax et Bak peuvent également être localisées dans la membrane du RE (Zong *et al.*, 2003) mais le mécanisme qui participe à ce ciblage n'est pour l'instant pas connu.

Bax peut être phosphorylée au niveau de différents résidus. Ainsi, la phosphorylation du résidu sérine 60 ne suffit pas à elle seule à activer la protéine (Arokium *et al.*, 2007) mais elle y participe en libérant les hélices- α 1 et 2 pour favoriser leurs interactions avec d'autres partenaires (Arokium *et al.*, 2007). Par ailleurs, Akt peut phosphoryler le résidu sérine 184, localisé dans l'hélice- α 9, ce qui empêche la translocation de Bax à la mitochondrie (Gardai *et al.*, 2004 ; Xing & Deng, 2006). *A contrario*, sa déphosphorylation par PPA2 entraîne l'activation de Bax et sa translocation à la MEM (Linseman *et al.*, 2004). Du fait que la sérine 184 soit positionnée au niveau de l'hélice- α 9, sa phosphorylation permet donc de modifier la conformation de la protéine et de réguler son activation (Arokium *et al.*, 2007). Enfin, le résidu sérine 163 peut être phosphorylé par la GSK3 β ce qui participe également à l'activation de Bax (Linseman *et al.*, 2004).

➤ Bak

La structure secondaire de Bak est proche de celle de Bax. Cependant, contrairement à Bax et aux protéines anti-apoptotiques, la poche hydrophobe de Bak est plus étroite et peut de ce fait difficilement contenir une hélice (Moldoveanu *et al.*, 2006). Ceci se traduit par une

exposition de l'hélice- α 9 de Bak qui contient des résidus hydrophobes à l'origine de son insertion membranaire (Martínez-Senac Mdel *et al.*, 2002), plus particulièrement au niveau de la MEM à l'état basal (Setoguchi *et al.*, 2006). L'hélice- α 1 est également importante pour la stabilité et les fonctions de Bak (Dewson *et al.*, 2009).

Bak peut être phosphorylée au niveau du résidu tyrosine 108, la fonction de cette modification post-traductionnelle restant très controversée. Certains travaux ont montré que la phosphorylation de Bak semblait être corrélée avec l'inactivation de la protéine (Fox *et al.*, 2010) alors qu'elle est déphosphorylée lorsque la cellule entre en apoptose. Cependant, Tran *et al.* (2013) ont montré que Bak n'est pas phosphorylée à l'état basal et donc ne requiert pas de déphosphorylation pour induire l'entrée en apoptose.

➤ Bok

Bok est surtout exprimée à l'état basal dans les ovaires, l'utérus ou bien les testicules (Hsu *et al.*, 1997) mais est au contraire sous-exprimée dans les cancers (Beroukhim *et al.*, 2010). Etant peu étudiée, les données concernant cette protéine sont très fragmentaires, surtout si l'on compare à Bax et Bak.

Bien que la structure tertiaire de la protéine Bok soit actuellement inconnue, on sait que cette protéine possède une séquence d'ancrage aux membranes du côté C-terminal (Echeverry *et al.*, 2013). Cependant, contrairement aux autres protéines pro-apoptotiques « multi-domaines », cette séquence semble plutôt cibler Bok vers le RE et l'appareil de Golgi, et non vers la mitochondrie (Echeverry *et al.*, 2013).

Enfin, la transcription de Bok est activée par p53 lors de dommages à l'ADN (Yakovlev *et al.*, 2004) et E2F lorsque les cellules sont privées de nutriments (Rodriguez *et al.*, 2006).

1.2.2. Rôles biologiques

Le rôle principal des protéines Bax et Bak est de **former un pore dans la MEM** afin de permettre la libération dans le cytosol de différents facteurs pro-apoptotiques et donc d'induire la mort cellulaire programmée. En effet, l'activation de Bax et de Bak est considérée comme un événement clé de l'apoptose : les cellules qui ne possèdent pas ces deux protéines sont incapables d'entrer en apoptose (Wei *et al.*, 2001). A la suite d'un stress cellulaire et sous le contrôle des autres membres de la famille Bcl-2, Bax et Bak changent de conformation. Bax va s'insérer dans la MEM et passer sous une forme « active ». Cette forme « active » est une

forme qui expose le sillon hydrophobe de la protéine afin d'interagir avec le domaine BH3 d'une autre protéine, à savoir Bax ou Bak (Dewson *et al.*, 2008). Les protéines vont alors s'oligomériser et former un pore membranaire qui va initier la phase effectrice de l'apoptose (Nechushtan *et al.*, 2001). Les différents modèles d'activation des protéines Bax et Bak sont proposés dans la partie 2 de ce chapitre.

Bax et Bak jouent également un rôle dans **l'apoptose céramide-dépendante** : Bak agit plutôt en amont de la synthèse de céramide alors que Bax agit en interaction avec le céramide pour favoriser l'apoptose. En effet, il a été montré que Bak peut réguler la production de céramide à longues chaînes en modifiant l'activité de la CerS, ceci en réponse à une irradiation aux UV-C (Siskind *et al.*, 2010). Il a également été montré que Bax favorise l'apoptose céramide-dépendante en stabilisant stériquement les canaux formés dans la MEM par les céramides (Perera *et al.*, 2012). Contrairement à Bcl-X_L, l'interaction entre Bax et les céramides stabilise le canal au niveau de l'interface avec les phospholipides membranaires, ce qui se traduit par une augmentation du diamètre du canal (Ganesan *et al.*, 2010). En résumé, Bak permet de favoriser la production de céramide pro-apoptotique qui va former des canaux au niveau de la MEM. Ces canaux sont ensuite stabilisés par Bax, permettant la formation de pores dans la MEM menant à l'apoptose (Siskind *et al.*, 2010).

Contrairement aux protéines anti-apoptotiques, les protéines Bax et Bak favorisent également le **stockage de calcium dans le RE**. En effet, les cellules Bax^{-/-} et Bak^{-/-} ont un faible taux de calcium endoplasmique, ainsi qu'un taux d'assimilation par la mitochondrie réduit (Scorrano *et al.*, 2003). De plus, ces cellules présentent une hyper-phosphorylation de l'IP₃R de type 1, ce qui explique l'augmentation de la fuite du calcium endoplasmique (Oakes *et al.*, 2005). Ces protéines agissent donc en association avec les protéines anti-apoptotiques pour réguler la libération de la signalisation dépendante du calcium endoplasmique.

Parallèlement, Bok agit en association avec Bax et/ou Bak pour induire l'apoptose (Echeverry *et al.*, 2013), notamment au niveau des ovaires où il agit avec Bax pour réguler le nombre et le stade de développement des ovocytes (Ke *et al.*, 2013). Schulman *et al.*, (2013) ont récemment montré que Bok se lie aux IP₃Rs, et plus particulièrement aux IP₃R de type 1 et 2. Cependant, contrairement à Bax et Bak qui permettent de contrôler l'efflux de calcium, Bok permet de stabiliser les IP₃Rs en les protégeant de la protéolyse. De plus, une boucle de rétrocontrôle est activée lorsque l'activité des IP₃Rs est persistante, grâce à une ubiquitinylation suivie d'une dégradation de Bok par le protéasome (Schulman *et al.*, 2013).

1.3. Les protéines pro-apoptotiques BH3-only

1.3.1. Généralités

Les protéines de la famille Bcl-2 appelées « BH3-only » comprennent les protéines Bad, Bid, Bim, Bmf, Bik, Hrk, PUMA et Noxa, et ne possèdent que le domaine BH3 dont la séquence est L-x-x-x-x-D (L = leucine, x = acide aminé, D = aspartate). Ces protéines ont deux rôles : elles peuvent soit être « activatrices » des protéines effectrices Bax et Bak, soit être « senseurs » d'un stress dans le but d'inhiber les protéines anti-apoptotiques de la même famille. Cependant, cette sous-famille n'induit pas directement la perméabilisation de la MEM.

Les protéines « activatrices » sont les protéines Bid, Bim et probablement PUMA, bien que des résultats contradictoires concernant cette dernière aient été rapportés (Chipuk & Green, 2009 ; Ren *et al.*, 2010). Elles interagissent directement avec les protéines Bax et Bak et induisent un changement conformationnel ainsi qu'une oligomérisation de ces dernières (Kuwana *et al.*, 2005 ; Cartron *et al.*, 2004). Les protéines BH3-only activatrices peuvent être inhibées par les protéines anti-apoptotiques, empêchant ainsi leur liaison avec Bax et Bak. De plus, un knock-out de ces trois protéines chez la souris induit le même phénotype que les cellules knock-out pour Bax et Bak (Ren *et al.*, 2010). Les autres protéines BH3-only « senseurs » comprennent les protéines Bad, Bmf, Hrk, Noxa et PUMA (Inohara *et al.*, 1997 ; Nakano & Vousden, 2001 ; Oda *et al.*, 2000 ; Puthalakath *et al.*, 2001 ; Yang *et al.*, 1995). Elles favorisent la mort cellulaire en interagissant avec les protéines anti-apoptotiques et libèrent ainsi les protéines « activatrices » et « effectrices » (Del Gaizo Moore *et al.*, 2007).

Les protéines BH3-only ont des affinités différentes pour chaque protéine anti-apoptotique ou pro-apoptotique effectrice avec une spécificité bien précise pour chacune d'entre elles (Tableau 5). Par exemple, Bim active spécifiquement Bax alors que Bid active spécifiquement Bak (Sarosiek *et al.*, 2013). De par ces propriétés, il a été suggéré que le profil d'expression des protéines BH3-only pourrait être utilisé comme un outil pour prédire la réponse cellulaire aux différents traitements anti-cancéreux (Cartron *et al.*, 2012 ; Deng *et al.*, 2007).

Au niveau structural, les protéines BH3-only sont des protéines intrinsèquement non structurées (IDP, *Intrinsically Disordered Proteins*). En effet, elles ne possèdent pas de structure secondaire tant qu'elles ne sont pas liées aux protéines cibles (Hinds *et al.*, 2007), à l'exception de Bid (Chou *et al.*, 1999). Cependant, cette dernière doit tout de même subir une

modification structurale pour être active : c'est sa forme tronquée, appelée tBid, qui adopte une nouvelle conformation et qui interagit avec Bax (Shamas-Din *et al.*, 2013).

En outre, le domaine BH3 des protéines BH3-only interagit avec la poche hydrophobe formée par les hélices α 2–5 et 8 des protéines multi-domaines pro- ou anti-apoptotiques. La régulation des protéines BH3-only peut se faire aussi bien au niveau transcriptionnel que post-traductionnel. En effet, au niveau transcriptionnel, les IDP, dont font partie les protéines BH3-only, possèdent un grand nombre de variants différents, ceci pour un gène donné (Rautureau *et al.*, 2010). De plus, ces protéines peuvent également subir des modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation, l'ubiquitinylation ou la protéolyse (Rautureau *et al.*, 2010).

1.3.2. Régulation et rôles des protéines BH3-only

➤ Bid

La protéine *BH3-interacting domain death agonist* (Bid, 195 résidus, 21 995 Da) est exprimée dans la plupart des tissus mais sous forme inactive. La forme active, appelée tBid, est obtenue par clivage par la caspase-8 lors de l'entrée en apoptose par la voie extrinsèque (Li *et al.*, 1998 ; Gross *et al.*, 1999). Dans d'autres conditions de stress, Bid peut aussi être clivée par d'autres protéases, telles que la caspase-2 lors d'un stress au niveau du RE (Upton *et al.*, 2008) ou le granzyme B, enzyme libérée par les lymphocytes (Waterhouse *et al.*, 2005).

Cependant, la protéolyse de Bid n'est pas la seule modification post-traductionnelle régulant l'activité de la protéine. En effet, Bid peut être phosphorylée au niveau de ses résidus sérines 61, 64 et 78 par ATM et ATR en réponse à des dommages à l'ADN ou à un stress réplcatif (Zinkel *et al.*, 2005 ; Kamer *et al.*, 2005 ; Maryanovich *et al.*, 2012). Ceci va favoriser l'arrêt du cycle cellulaire dans le but de réparer les dommages causés et protège les cellules contre l'entrée en apoptose. De même, les caséine kinase I et II phosphorylent également Bid, atténuant son clivage par la caspase-8, ce qui protège les cellules d'une entrée en apoptose (Desagher *et al.*, 2001).

D'un point de vue fonctionnel, tBid est une protéine « activatrice », capable d'interagir avec Bax et Bak. Lorsque Bid est clivée en tBid, celle-ci est transloquée vers la MEM où elle interagit avec Bax, favorisant l'insertion de celle-ci dans la MEM (Lovell *et al.*, 2008). Cependant, Bcl-X_L peut empêcher cette interaction en interagissant avec tBid (Billen *et al.*,

2008 ; Lovell *et al.*, 2008). Enfin, tBid peut également s'homo-oligomériser pour former directement des pores membranaires, de la même façon que Bax et Bak (pour revue, Grimberg, 2002).

➤ Bim

Parmi la vingtaine d'isoformes différentes de la protéine Bim (*Bcl-2 interacting mediator of cell death*) qui résultent d'épissages alternatifs, trois variants sont majoritaires : Bim_S (108 résidus d'acides aminés, 12 717 Da), Bim_L (138 résidus d'acides aminés, 15 967 Da) et Bim_{EL} (198 résidus d'acides aminés, 22 171 Da). Bim est exprimée dans plusieurs types cellulaires, comme les cellules épithéliales, les cellules neuronales et les cellules germinales, mais on la retrouve majoritairement exprimée dans les cellules lymphoïdes (O'Reilly *et al.*, 2000). De plus, elle est importante dans les mécanismes de régulation du système immunitaire (Hughes *et al.*, 2008).

L'expression de Bim peut être modulée par différents facteurs de transcription : FOXO3a agit lors de la suppression de cytokines dans le milieu environnant (Dijkers *et al.*, 2000) ; CHOP active l'expression de Bim lors d'un stress au niveau du RE (Puthalakath *et al.*, 2007) ; Myc dans les lymphocytes B (Egle *et al.*, 2004). De plus, bien que Bim ne soit pas une cible transcriptionnelle de p53, la perte de son expression rend les cellules résistantes à divers agents induisant des dommages à l'ADN (Erlacher *et al.*, 2005).

Au niveau post-transcriptionnel, le miARN-17~92 permet de réprimer l'expression de Bim (Ventura *et al.*, 2008), ce miARN étant inhibé à son tour par les glucocorticoïdes (Molitoris *et al.*, 2011). De même, le miARN-192, qui est surexprimé dans les cancer du poumon, cible Bim (Zhang *et al.*, 2014b).

Les variants Bim_L et Bim_{EL} peuvent être phosphorylés. Selon la protéine kinase impliquée, les effets sur l'activité de Bim peuvent être très différents. Ainsi, la phosphorylation de Bim_{EL} par ERK au niveau du résidu sérine 69 permet de dissocier Bim_{EL} de Mcl-1 et de Bcl-X_L, de favoriser son ubiquitinylation et donc sa dégradation par le protéasome (Ewings *et al.*, 2007). De plus, ERK peut également phosphoryler Bim_{EL} au niveau du résidu sérine 55, inhibant ainsi son activité pro-apoptotique (Harada *et al.*, 2004). La phosphorylation de Bim_{EL} par JNK permet, quant à elle, d'augmenter son activité pro-apoptotique (Putcha *et al.*, 2003). A l'inverse, après un stress au niveau du RE, la *Protein Phosphatase 2* (PPA2) peut déphosphoryler Bim, augmentant ainsi son activité pro-apoptotique (Puthalakath *et al.*, 2007).

Parallèlement, la protéine Bim peut être régulée *via* d'autres mécanismes. En effet, Bim peut être séquestrée par la chaîne légère de la dynéine, le complexe moteur associé aux microtubules (Puthalakath *et al.*, 1999). Ce phénomène protège la cellule de l'effet pro-apoptotique de Bim.

Enfin, Bim peut agir en association avec PUMA pour induire l'apoptose, que ce soit à la suite d'une déprivation en cytokines, d'une exposition aux irradiations γ ou à la dexaméthasone ou après un stress du RE (Erlacher *et al.*, 2006 ; Ekoff *et al.*, 2007). Ceci se fait en activant Bax et Bak directement et/ou indirectement, en inhibant les protéines anti-apoptotiques.

➤ PUMA

La protéine *p53 upregulated modulator of apoptosis* (PUMA)- α (193 résidus, 20 532 Da) et la protéine PUMA- β (131 résidus, 14 459 Da) sont les deux isoformes de la protéine ayant une activité pro-apoptotique. La séquence en acides aminés des deux protéines est identique côté C-terminal, l'isoforme β ayant une séquence différente et plus courte côté N-terminal. PUMA possède 2 domaines fonctionnels : le domaine BH3 et un domaine d'adressage mitochondrial dans la région C-terminale (Yu *et al.*, 2003 ; Yee & Vousden, 2008) qui va lui permettre d'interagir au niveau mitochondrial avec Bax et Bak directement et/ou avec d'autres protéines anti-apoptotiques pour libérer Bax et Bak et permettre l'entrée de la cellule en apoptose (Yu *et al.*, 2003)

La transcription du gène *PUMA* peut être dépendante ou indépendante du facteur de transcription p53. L'activation de l'expression de PUMA par p53 peut être induite par différents stress comme un traitement par des agents génotoxiques (UV, irradiation γ et agents chimiothérapeutiques) (Wang *et al.*, 2007 ; Han *et al.*, 2013) mais aussi par un stress oxydant, une déprivation en facteurs de croissance ou en conditions hypoxiques (Yu *et al.*, 2003 ; Yu & Zhang, 2008 ; Wang *et al.*, 2008a ; Pike *et al.*, 2012). La régulation du gène codant pour PUMA par p53 est possible grâce à la présence de 2 sites de liaison de p53 en amont du codon d'initiation (Yu *et al.*, 2003). De plus, un activateur de p53, la Tip60, permet de réguler indirectement l'expression de PUMA. Cette protéine est nécessaire à p53 pour choisir le devenir de la cellule entre l'arrêt du cycle cellulaire lors de la réparation des dommages et l'entrée en apoptose. En présence d'un stress important, la Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) phosphoryle Tip60 sur sa sérine 86 permettant son activation. Tip 60 va alors acétyler p53 sur

sa lysine 120 et l'histone H4 au niveau du promoteur de PUMA (Charvet *et al.*, 2011). Un deuxième mécanisme a également été décrit impliquant, non pas la GSK-3, mais p38 lors de dommages à l'ADN (Xu *et al.*, 2014a) : p38 phosphoryle Tip60 sur sa thréonine 158, permettant l'acétylation de p53 sur sa lysine 120. En conditions de privations de cytokines ou de facteurs de croissance, l'expression de PUMA augmente indépendamment de p53, grâce à d'autres facteurs de transcription tels que FOXO3a, Sp1 ou p73 (Ming *et al.*, 2008 ; Ray *et al.*, 2011 ; You *et al.*, 2006). De même, lors d'un changement de statut redox (hypoxie, anoxie, génération d'ERO), PUMA est surexprimée avec l'implication de p53 et/ou d'autres facteurs de transcription (Steekley *et al.*, 2007 ; Pike *et al.*, 2012).

PUMA peut également être régulée par des miARN, comme les miARN-221 et miARN-222 (Zhang *et al.*, 2010) ou le miARN-149 (Ding *et al.*, 2013). Au niveau post-traductionnel, PUMA peut être phosphorylée sur différents résidus ce qui permet de réguler son activité. Ainsi, PUMA peut être phosphorylée au niveau du résidu sérine 10 ce qui va augmenter sa dégradation par le protéasome et favoriser ainsi la survie cellulaire (Fricker *et al.*, 2010). De plus, HER2 est également capable de phosphoryler PUMA au niveau des tyrosines 58, 152 et 172, ce qui déstabilise la protéine et favorise également la survie cellulaire (Carpenter *et al.*, 2013).

Le rôle biologique de PUMA est d'activer de l'apoptose. PUMA se lie avec une forte affinité à toutes les protéines anti-apoptotiques de la même famille (Lomonosova & Chinnadurai, 2008) mais pourrait également interagir avec les protéines Bax et Bak (Kim *et al.*, 2009b ; Gallenne *et al.*, 2009), ce dernier point étant encore controversé puisqu'on ne sait pas encore quel model d'activation, direct ou indirect, est mis en jeu lors de l'entrée en apoptose (voir partie 2 de ce chapitre). Dans le model d'activation direct, PUMA intervient à la fois *via* un rôle de protéine « senseur » en interagissant avec les protéines anti-apoptotiques et *via* un rôle d'activateur de Bax et Bak. Dans le model d'activation indirecte, PUMA, tout comme Bim et tBid, interagit avec l'ensemble des protéines anti-apoptotiques, permettant la libération de Bax et Bak qui sont constitutivement activées (pour revue, Lomonosova & Chinnadurai, 2008). Parallèlement, PUMA est également capable de libérer la forme cytosolique de p53 qui est inhibée par Bcl-X_L (Vousden, 2005). Une fois libérée, la p53 cytosolique est ensuite capable d'activer Bax et d'induire la mort cellulaire programmée.

➤ Bad

La protéine *Bcl2-associated agonist of cell death* (Bad) (168 résidus, 18 392 Da) interagit, contrairement à tBid, Bim et PUMA, uniquement avec les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 afin de les neutraliser (Bcl-2, Bcl-X_L et Bcl-W).

L'activité de Bad est principalement régulée par modifications post-traductionnelles, notamment par phosphorylation. Cette modification permet d'inhiber son interaction avec les protéines anti-apoptotiques grâce à des kinases pro-survie. Bad peut être phosphorylée au niveau de plusieurs résidus sérines : la sérine 112 est phosphorylée par la voie MAPK (Scheid *et al.*, 1999) ; la sérine 136 est phosphorylée par la voie PI3K/AKT (Datta *et al.*, 1997) ; la sérine 155, localisée au niveau du domaine BH3, est phosphorylée par la Protéine kinase A (PKA) (Datta *et al.*, 2000). Les phosphorylations des sérines 112 et 136 induisent l'interaction de Bad avec la protéine 14-3-3 qui la séquestre au niveau du cytosol et inhibe son activité pro-apoptotique (Datta *et al.*, 2000). De plus, la phosphorylation de la sérine 136, permettant le recrutement de 14-3-3, améliore l'accessibilité de la sérine 155 aux kinases et augmente ainsi la phosphorylation de ce résidu (Datta *et al.*, 2000).

Parallèlement à la phosphorylation, Bad peut aussi être clivée par les caspases après une déprivation en cytokines (Condorelli *et al.*, 2001) ou une activation du récepteur au TGF- β (Kim *et al.*, 2002a). Il a également été montré que Bad peut être clivée par les caspases-2, -3, -7, -8, -10 et le Granzyme B *in vitro* (Condorelli *et al.*, 2001). La forme tronquée au niveau N-terminal issue de ce clivage a une meilleure affinité avec Bcl-X_L et la MEM, ce qui favorise ainsi l'entrée en apoptose.

En outre, Bad est également impliquée dans le cycle cellulaire et favorise le passage des cellules en phase S (Chattopadhyay *et al.*, 2001). De plus, cette protéine favorise l'autophagie en bloquant Bcl-2 et Bcl-X_L et en libérant ainsi Beclin-1 (Maiuri *et al.*, 2007). Enfin, Bad est également impliquée dans le métabolisme du glucose et dans la sécrétion d'insuline (Danial *et al.*, 2003).

➤ Noxa

Noxa (« dommages » en latin), aussi appelée PMAIP1 (*Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*), est retrouvée sous la forme de deux variants distincts, le variant 1 (54 résidus, 6 030 Da) et le variant 2 (136 résidus, 14 955 Da) (Wang & Sun, 2008b). De plus,

ce gène est faiblement exprimé à l'état basal dans la majorité des organes mais est augmenté après une irradiation (Oda *et al.*, 2000). Contrairement aux autres protéines pro-apoptotiques, cette protéine BH3-only inhibe uniquement la protéine anti-apoptotique Mcl-1 (Chen *et al.*, 2005) en favorisant sa dégradation par le protéasome (Czabotar *et al.*, 2007).

Selon le type de stress induit, la transcription du gène codant pour Noxa peut être activée par différents facteurs de transcription tels que p53, E2F1, c-MYC ou HIF-1 α (Oda *et al.*, 2000 ; Hershko & Ginsberg, 2004 ; Kim *et al.*, 2004a ; Nikiforov *et al.*, 2007). Par exemple, lorsque des dommages à l'ADN sont induits par irradiation ou par des agents chimio-thérapeutiques, la protéine p53 active l'expression du gène. En effet, le promoteur du gène codant pour Noxa contient un motif de liaison à p53 en amont du site initial de transcription. De plus, il a été montré qu'en absence de p53 (p53^{-/-}), l'expression de Noxa n'est pas activée, ce qui empêche l'entrée des cellules en apoptose (Schuler *et al.*, 2003).

Au niveau post-traductionnel, Noxa peut être ubiquitinylée au niveau des trois résidus lysines pour être dégradé par le protéasome (Baou *et al.*, 2010). De plus, Brinkmann *et al.* (2013) ont montré qu'une dérégulation de cette ubiquitinylation est utilisée par certaines cellules cancéreuses pour résister aux agents génotoxiques utilisés en chimiothérapie. Ces cellules n'expriment pas UCH-L1, l'enzyme qui désubiquitinylyle Noxa et la protège de sa dégradation par le protéasome. Cependant, Noxa peut aussi être dégradée indépendamment d'une ubiquitinylation. En effet, Craxton *et al.* (2012) ont montré que la dégradation par le protéasome de Noxa peut être indépendante de la présence de résidus lysines, nécessaires à l'ubiquitinylation. De plus, Pang *et al.* (2014) ont également montré la présence d'une séquence en acides aminés côté C-terminal responsable de la stabilisation de Noxa.

Noxa peut également être phosphorylée au niveau du résidu sérine 13 par la CDK5 (Lowman *et al.*, 2010). Cette modification post-traductionnelle induit la séquestration de la protéine dans le cytosol ce qui a pour conséquence une activation de la survie cellulaire. Lorsque cette phosphorylation est absente, Noxa interagit avec Mcl-1 au niveau de la mitochondrie et induit l'entrée en apoptose (Lowman *et al.*, 2010).

Quand Noxa interagit avec la protéine anti-apoptotique Mcl-1, cela favorise l'ubiquitinylation de Mcl-1 par l'E3 ligase, MULE, et Noxa entre en compétition avec la désubiquitinylylase USP9X (Gomez-Bougie *et al.*, 2011). Ainsi, en plus d'inhiber stériquement Mcl-1, Noxa contrôle sa dégradation par le protéasome en régulant son ubiquitinylation.

Cependant, des résultats contradictoires ont montré que l'association entre Noxa et Mcl-1 peut induire l'apoptose sans qu'il y ait de modification de l'expression de Mcl-1 (Craxton *et al.*, 2012).

Enfin, il semble que les différentes lésions à l'ADN soient modulées par l'expression de PUMA et de Noxa. En effet, les lymphocytes et les fibroblastes n'exprimant pas Noxa restent relativement sensibles aux irradiations γ et aux agents chimio-thérapeutiques induisant des dommages à l'ADN (Shibue *et al.*, 2003), mais les rend résistants aux rayonnements ultraviolets comparativement à une perte de PUMA (Naik *et al.*, 2007).

➤ Bik

La protéine *Bcl-2-interacting killer* (Bik) (160 résidus, 18 016 Da) est une protéine « senseur » capable d'interagir et d'inhiber Bcl-2 et Bcl-X_L (Boyd *et al.*, 1995). Cette protéine contient le domaine BH3, ainsi qu'un domaine transmembranaire. Ces domaines sont tous les deux importants pour l'activité pro-apoptotique de Bik (Elangovan & Chinnadurai, 1997). Bik est localisée principalement au niveau du RE (Germain *et al.*, 2002)

La transcription du gène *BIK* peut être régulée *via* différents facteurs de transcription, ceci en fonction du contexte cellulaire. Il est notamment la cible de p53 (Mathai *et al.*, 2002), de E2F1 (Real *et al.*, 2006) et de STAT1 (Mebratu *et al.*, 2008).

Au niveau post-traductionnel, Bik peut être phosphorylée au niveau des résidus thréonine 33 et sérine 35 (Verma *et al.*, 2001). Une mutation de ces sites de phosphorylation diminue l'activité pro-apoptotique de la protéine (Verma *et al.*, 2001), alors qu'une mutation mimant cette phosphorylation (mutation des deux résidus en aspartate) augmente l'interaction de Bik avec Bcl-2 et Bcl-X_L et favorise l'entrée en apoptose (Li *et al.*, 2003). En outre, Bik peut également être dégradée au niveau du protéasome (Zhu *et al.*, 2005) indépendamment ou non d'une ubiquitinylation (Sun *et al.*, 2015). De plus, Bik peut également être dégradée par une protéase, RHBDD1, pour donner deux fragments dont le plus court est destiné à être dégradé par le protéasome (Wang *et al.*, 2008c).

En raison de sa localisation préférentielle au niveau du RE, le mécanisme pro-apoptotique de Bik est différent de celui des autres protéines BH3-only. En effet, Bik agit sur la libération du calcium du RE, ceci en fonction de la localisation de Bax et Bak au niveau du RE (Mathai *et al.*, 2005). En effet, l'augmentation de l'expression de Bik inhibe Bcl-2 et Bcl-

X_L au niveau du RE, favorisant ainsi l'association entre Bax et Bak et la libération du calcium endoplasmique. Ceci va induire le recrutement de la DRP1 (*Dynamin related protein 1*) à la mitochondrie dont le rôle est de remodeler les crêtes mitochondriales afin de libérer le cytochrome c au cytosol (Figure 23).

Figure 23 : Rôle de Bik dans l'entrée en apoptose (d'après Chinnadurai *et al.*, 2008).

➤ Bmf

La protéine *Bcl-2-modifying factor* (Bmf) est majoritairement exprimée dans les cellules hématopoïétiques, telles que les cellules B et T immatures (Labi *et al.*, 2008), ainsi que dans les glandes mammaires (Schmelzle *et al.*, 2007) et les organes génitaux (Show *et al.*, 2008 ; Liew *et al.*, 2014). Trois variants ont été décrits : le premier (isoforme I : 184 résidus ; 20 508 Da) est celui ayant une activité pro-apoptotique (Puthalakath *et al.*, 2001) ; les deux autres (isoforme II : 163 résidus, 17 994 Da ; isoforme III : 129 résidus ; 14 150 Da) ne semblent pas avoir cette propriété (Morales *et al.*, 2004).

L'expression du gène *BMF* peut être augmentée *via* différentes voies de signalisation, notamment par le TGF- β (Ramjaun *et al.*, 2007), l'AMPK (*Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase* ; Kilbride *et al.*, 2010) ou par la voie JNK (*c-Jun NH(2)-terminal kinase* ; Tianhu *et al.*, 2010). A l'inverse, le gène *BMF* peut aussi être réprimé par les voies ERK et AKT (Schmelzle *et al.*, 2007). De plus, au niveau post-transcriptionnel, l'expression de Bmf peut être réprimée par le miARN miR-34c-5p (Catuogno *et al.*, 2013).

La protéine Bmf peut également être phosphorylée par ERK2 au niveau des résidus sérines 74 et 77 (Lei & Davis, 2003 ; Shao & Aplin, 2012), ce qui diminue son activité pro-apoptotique par un mécanisme encore inconnu (Hübner *et al.*, 2010 ; Shao & Aplin, 2012).

A l'état basal, la protéine Bmf est séquestrée au niveau du cytosquelette, plus précisément au niveau de la myosine V (Puthalakath *et al.*, 2001). En effet, Bmf peut interagir avec la chaîne légère de la dynéine pour être inhibée. En réponse à un signal pro-apoptotique, tel qu'une irradiation aux UV ou bien une perte de l'adhésion, Bmf est libérée et va se localiser

au niveau de la mitochondrie pour favoriser l'entrée en apoptose (Puthalakath *et al.*, 2001). Au niveau mitochondrial, Bmf peut alors interagir avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-X_L et Bcl-W et les inhiber (Chen *et al.*, 2005 ; Kuwana *et al.*, 2005).

➤ Hrk

Harakiri (Hrk ; 91 résidus ; 9 884 Da) est une protéine pro-apoptotique majoritairement exprimée dans les cellules neuronales déprivées en cytokines et qui provoque leur entrée en apoptose (Coultas *et al.*, 2007 ; Imaizu *et al.*, 1997). En revanche, bien que Hrk soit également exprimée dans les cellules hématopoïétiques (Inohara *et al.*, 1997), elle n'est pas essentielle pour leur entrée en apoptose (Coultas *et al.*, 2007). De plus, Hrk est également sur-exprimée dans les cancers du sein ayant un pronostic favorable (Tvrdík *et al.*, 2012).

Au niveau transcriptionnel, le gène *HRK* peut être activé par différents stimuli. En effet, dans le cancer de la prostate, la transcription de *HRK* est favorisée par la surexpression du récepteur à l'angiotensine II, indépendamment des facteurs de transcription p38 MAPK, p44/42 MAPK et p53 (Pei *et al.*, 2014). De plus, *HRK* est une cible de E2F1 et induit l'apoptose dans les mélanomes (Hao *et al.*, 2012b). Enfin, Rizvi *et al.* (2011) ont montré que le C6-Cer induit la phosphorylation de JNK, ce qui augmente l'expression de Hrk (Rizvi *et al.*, 2011 ; Ma *et al.*, 2007).

Au niveau structural, la protéine Hrk possède un domaine transmembranaire en plus du domaine BH3 (Inohara *et al.*, 1997). Ce domaine transmembranaire hélicoïdal lui permet de s'insérer dans la MEM (Bernabeu *et al.*, 2007). A l'état basal, le domaine cytosolique de Hrk (comprenant le domaine BH3) est majoritairement désordonné (Barrera-Vilarmau *et al.*, 2011) mais il change de conformation pour donner une hélice α lorsqu'il interagit une protéine anti-apoptotique comme Bcl-2 ou Bcl-X_L (Barrera-Vilarmau *et al.*, 2011).

2. Implication des protéines de la famille Bcl-2 dans la perméabilisation de la MEM

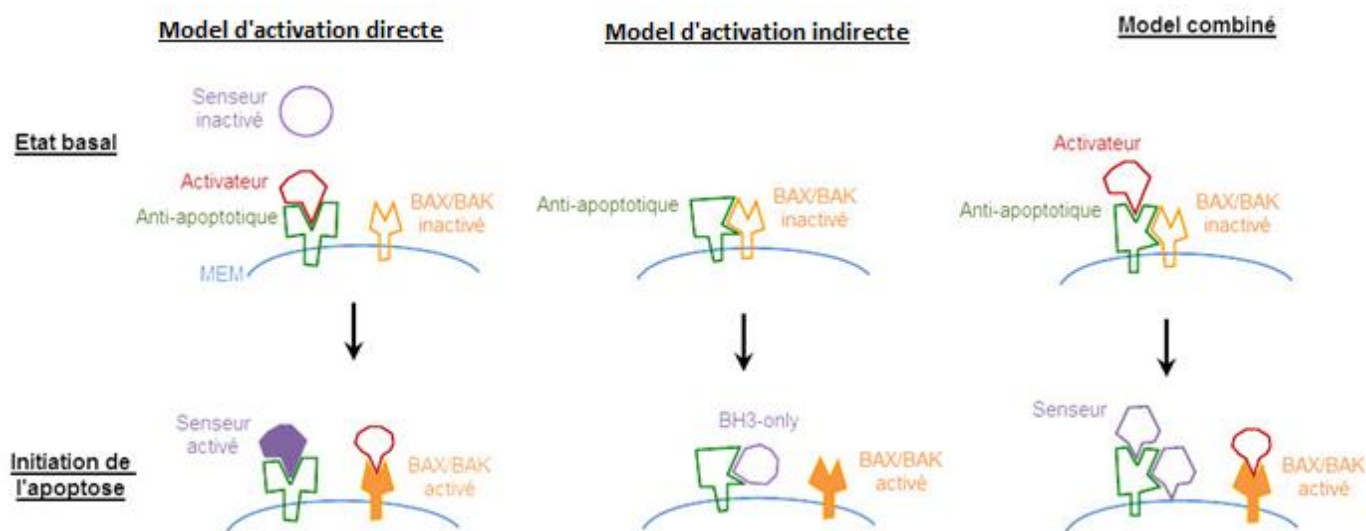


Figure 24 : Modèles d'activation de l'apoptose.

2.1. Modèle d'activation directe

Dans le modèle d'activation directe (Figure 24), les protéines BH3-only sont classées en 2 catégories selon leur affinité pour chaque protéine anti-apoptotique de la famille Bcl-2 (Tableau 5) : les « activateurs » et les « senseurs » (Letai *et al.*, 2002).

Dans les cellules à l'état basal, les protéines BH3-only « senseurs » sont libres mais inactives alors que les protéines BH3-only « activatrices » sont séquestrées par les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Lorsqu'un signal apoptotique est détecté, les protéines BH3-only « senseurs » sont activées selon différents modes (activation de la transcription, modifications post-transcriptionnelles ou modifications post-traductionnelles) et vont se lier aux protéines anti-apoptotiques grâce à leur affinité plus élevée pour ces dernières. Ceci permet alors de libérer les protéines BH3-only « activatrices » qui peuvent activer Bax et Bak, induisant la perméabilisation de la MEM (Kuwana *et al.*, 2005 ; Kim *et al.*, 2006). En résumé, dans ce modèle, la fonction des protéines anti-apoptotiques est de séquestrer les protéines BH3-only « activatrices » et non les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak.

Pour appuyer ce modèle, il a été montré que les protéines « activatrices » Bid, Bim et PUMA sont inhibées par les protéines anti-apoptotiques *in vitro* (Letai *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2006). De plus, Lovell *et al.* (2008) ont montré que la forme tronquée de Bid (tBid) permet l'insertion et l'oligomérisation de Bax dans des liposomes. Concernant Bim, il existe 3 principales isoformes (Bim_L, Bim_{EL} et Bim_S) dont seulement deux permettent d'activer directement Bax, à savoir Bim_{EL} (Yamaguchi & Wang, 2002) et Bim_S (Weber *et al.*, 2007), Bim_L en étant incapable (Terradillos *et al.*, 2002). Le rôle de la protéine PUMA est beaucoup moins clair, cette protéine ayant été décrite comme ayant un rôle aussi bien d'« activateur » (Gallenne *et al.*, 2009) que de « senseur » (Kuwana *et al.*, 2005).

Cependant, Willis *et al.* (2007) ont montré que ce modèle n'est pas applicable dans certains cas. En effet, dans leurs conditions expérimentales, Bak n'interagit avec aucune protéine BH3-only ; Bax ne co-immunoprécipite pas avec les formes Bim_{EL} et Bim_L dans les cellules apoptotiques et interagit de façon très faible avec tBid et Bim_S. De plus, il apparaît dans cette étude qu'aucune protéine BH3-only « activatrice » ne soit essentielle pour l'entrée des cellules en apoptose.

2.2.Modèle d'activation indirecte

Dans le modèle d'activation indirecte (Figure 24), également appelé modèle de déplacement, les protéines Bax et Bak sont actives constitutionnellement et sont inhibées par les protéines anti-apoptotiques dans les cellules au niveau basal. Afin d'amorcer l'apoptose, l'expression des protéines BH3-only est augmentée, permettant leur liaison avec les protéines anti-apoptotiques et ainsi la libération des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak. Etant donné que chaque protéine BH3-only possède une affinité différente pour chaque protéine anti-apoptotique, une combinaison de protéines BH3-only est nécessaire pour induire l'apoptose (Chen *et al.*, 2005). En résumé, dans ce modèle, les protéines BH3-only ne se lient pas directement à Bax et Bak pour les activer, mais permettent de les libérer des protéines anti-apoptotiques.

Pour argumenter en faveur à ce modèle, il a été montré qu'au niveau basal, Bak se lie sélectivement aux protéines anti-apoptotiques Bcl-X_L et Mcl-1, mais pas à Bcl-2, Bcl-W, ni à Bcl2A1. Après induction de l'apoptose, Noxa va se lier à Mcl-1 pour libérer Bak, ce qui va induire la dégradation de Mcl-1 et favoriser l'entrée en apoptose (Willis *et al.*, 2005). De même,

il a été montré que l'expression de Bik permet de libérer Bak de Mcl-1 et de Bcl-X_L (Shimazu *et al.*, 2007).

2.3.Modèle commun

Le modèle commun (Figure 24) fait intervenir les protéines anti-apoptotiques autant comme des inhibiteurs de Bax et Bak que des protéines BH3-only « activatrices ». En effet, ce troisième modèle propose que les protéines anti-apoptotiques séquestrent les protéines BH3-only « activatrices » afin de prévenir l'activation de Bax et Bak, mais se lient et inhibent aussi les protéines Bax et Bak à la membrane. De plus, lors de l'induction de l'apoptose, la production de protéines BH3-only « senseurs » va permettre la neutralisation des protéines anti-apoptotiques en libérant les « activateurs » et Bax/Bak de la membrane. A titre d'exemple, Bcl-X_L est capable de fixer Bax et tBid à la membrane (Billen *et al.*, 2008) afin de les inhiber. Lorsqu'il y a production de Bad, celle-ci va alors se lier à Bcl-X_L, libérant tBid et Bax. tBid peut alors se lier à la membrane externe mitochondriale et recruter Bax pour favoriser la perméabilisation de la MEM (Lovell *et al.*, 2008).

3. Les inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques

3.1.Rôle des protéines de la famille Bcl-2 dans le développement et le maintien des cancers

Les protéines de la famille Bcl-2 sont des régulateurs importants de l'entrée en apoptose mitochondriale. Dans les tissus sains, les protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques de cette famille fonctionnent de façon coordonnée pour réguler l'apoptose. Dans les cellules cancéreuses, cette coordination est modifiée et la mort cellulaire programmée ne peut plus avoir lieu, ce qui se traduit par une résistance aux agents chimio-thérapeutiques et aux rayonnements ionisants. En effet, les cellules tumorales ont la capacité d'activer des voies qui s'opposent à l'entrée des cellules en apoptose (Deng *et al.*, 2007).

3.1.1. Augmentation des protéines anti-apoptotiques

L'augmentation de l'expression des protéines anti-apoptotiques **Bcl-2**, **Bcl-X_L** et/ou **Mcl-1** en conditions basales est associée à une agressivité plus importante des cancers et/ou à une chimio- et une radiorésistance élevée (Walczak *et al.*, 2000 ; Keitel *et al.*, 20014 ; Michels *et al.*, 2014). Ceci est expliqué par le fait que l'augmentation des protéines anti-apoptotiques

permet de favoriser la séquestration des protéines effectrices, Bax et Bak, afin d'inhiber la formation du pore mitochondrial et donc d'empêcher l'initiation de l'apoptose.

Parallèlement, la protéine Bcl-2 est également impliquée dans la régulation du stress oxydant. En effet, des études portant sur une expression physiologique de Bcl-2 ont montré un effet pro-oxydant de cette protéine (Kowaltowski & Fiskum, 2005 ; Chen & Pervaiz, 2007). En fait, l'expression stable de Bcl-2 favorise l'assemblage des sous unités COX Va et COX Vb, augmentant ainsi l'activité de la chaîne respiratoire (Chen & Pervaiz, 2010). Ceci se traduit par une augmentation modérée et chronique des anions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$), ce qui stimule l'expression d'agents anti-oxydants et de certaines voies de survie (Pervaiz & Clement, 2007). En effet, le ratio intracellulaire entre le taux d' $O_2^{\bullet-}$ et le taux de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) modifie l'expression des enzymes anti-oxydantes. De ce fait, la production d' $O_2^{\bullet-}$ est un signal de survie, alors que la production d' H_2O_2 est un signal pro-apoptotique (Figure 25 ; Clement *et al.*, 1998 ; Pervaiz & Clement, 2007).

Figure 25 : Rôle des espèces réactives de l'oxygène dans oncogénèse (d'après Low *et al.*, 2011).

3.1.2. Diminution des protéines effectrices

De plus, il a été montré qu'une diminution de l'expression ou une perte d'activité des protéines pro-apoptotiques multidomaines, **Bax** (Yang *et al.*, 2012) et/ou **Bak** (Wang *et al.*, 2001) sont souvent impliquées dans la progression tumorale et l'échappement à l'apoptose. Cependant, la perte de l'expression de **Bok** semble, quant à elle, jouer un rôle mineur dans l'initiation et la progression des cellules tumorales (Ke *et al.*, 2012).

3.1.3. Diminution des protéines BH3-only

Enfin, une perte des protéines BH3-only, ou bien leur inactivation, ont également été détectées dans un grand nombre de cancers. La protéine **Bim** a été la première à être identifiée comme étant une protéine suppresseur de tumeurs. En effet, la perte du gène *Bim* sur un seul allèle accélère la lymphomagénèse (Egle *et al.*, 2004). De plus, le gène *Bim* est délété dans un

grand nombre de lymphomes (Tagawa *et al.*, 2005), tout comme l’hyper-méthylation de son promoteur, sa mutation (Mestre-Escorihuela *et al.*, 2007) ou sa répression par certains miARN (Zhang *et al.*, 2014). Parallèlement, l’expression de la protéine **PUMA** est également diminuée, notamment dans les cancers des VADS résistants aux chimiothérapies (Sun *et al.*, 2007) alors que sa perte accélère la lymphomagénèse chez la souris (Michalak *et al.*, 2009). Dans la même étude, Michalak *et al.* (2009) montrent que *PMAIP1*, le gène codant pour la protéine **Noxa**, est également un gène suppresseur de tumeur, mais qu’il intervient surtout dans la tumorigénèse induite par les rayonnements γ .

Ainsi, une surexpression des protéines anti-apoptotiques ou une diminution de l’expression des protéines pro-apoptotiques sont souvent associées à un mauvais pronostic médical et à une mauvaise réponse aux traitements, particulièrement dans le cas des cancers des VADS (Michaud *et al.*, 2009 ; Yamano *et al.*, 2010 ; Farnebo *et al.*, 2011 ; Čapková *et al.*, 2014). C’est donc la balance entre l’expression des protéines pro-apoptotique et des protéines anti-apoptotiques, plutôt que le profil d’expression des protéines anti-apoptotiques, qui régule la mort des cellules cancéreuses (Korsmeyer *et al.*, 1993 ; Del Gaizo Moore & Letai, 2013). A cela s’ajoute des modifications d’expression des régulateurs du cycle cellulaire (p53, Rb, p27, p21), convergeant vers la progression tumorale.

3.2. Différents inhibiteurs

Les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 étant impliquées dans l’initiation et la progression de la carcinogénèse, ainsi que dans leur chimio- et radorésistance, elles demeurent des cibles attractives pour le traitement de nombreux cancers et différentes stratégies ont ainsi été proposées dans le but de les inhiber.

3.2.1. Oligonucléotides anti-sens

La première approche pour inhiber la protéine Bcl-2 a été d’utiliser un oligonucléotide anti-sens dirigé contre les six premiers codons de l’ARNm (ARN messenger) codant pour Bcl-2 comme l’Oblimersen sodium (aussi appelée G3139 ou Genasense®, fabriqué par Genta) (Klasa *et al.*, 2002). Cette molécule a permis d’augmenter l’efficacité de certains agents chimiothérapeutiques au cours d’essais cliniques de phase I [cancer de la prostate (Chi *et al.*, 2001 ; Tolcher *et al.*, 2004), leucémie (Marcucci *et al.*, 2003)] et de phase II et III [mélanome (Bedikian *et al.*, 2006), leucémies (O’Brien *et al.*, 2009a)]. En revanche, d’autres études n’ont pas montré d’amélioration clinique significative dans le cancer du poumon à petites cellules

(Rudin *et al.*, 2008) et ce nouvel agent chimio-thérapeutique n'a pas été approuvé par la *Food and Drug Administration*.

3.2.2. BH3-mimétiques

Les BH3-mimétiques sont de petites molécules qui miment les protéines BH3-only et qui ont donc la capacité de se lier et d'inhiber les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Certains d'entre eux ont une toxicité élevée ou des propriétés pharmacologiques trop limitées pour être exploitées en clinique : c'est le cas de l'HA14-1 (Wang *et al.*, 2000) ou de l'antimycine A (Tzung *et al.*, 2001). Les composés décrits ci-après sont les plus prometteurs qui font, ou ont fait, l'objet d'études cliniques.

➤ La famille du Gossypol

Le Gossypol est un polyphénol (Figure 26) extrait des graines de cotonniers et qui existe sous deux formes énantiomères, le (+)Gossypol et le (-)Gossypol. Le (-)Gossypol (AT-101) est l'énantiomère qui possède l'activité anti-tumorale la plus importante (Liu *et al.*, 2002) et c'est le premier composé pour lequel on a montré l'existence d'une interaction réelle avec les protéines anti-apoptotiques, Bcl-2, Bcl-X_L et Mcl-1 (Kitada *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2003) : c'est donc le premier « BH3-mimétique » qui a été découvert. En interagissant et donc en inhibant ces protéines, le (-)Gossypol permet de restaurer l'apoptose dans les cellules tumorales résistantes à d'autres chimiothérapies *in vitro* et *in vivo*, notamment dans les cancers des VADS résistants au cisplatine (Oliver *et al.*, 2005 ; Bauer *et al.*, 2005 ; Wolter *et al.*, 2006). Malheureusement, ce composé présente une forte toxicité ainsi qu'une efficacité décevante lors des études cliniques (Van Poznak *et al.*, 2001 ; Ready *et al.*, 2011 ; Sonpavde *et al.*, 2012).

Dans le but de réduire la toxicité de la molécule causée principalement par les fonctions aldéhydiques, un premier dérivé du (-)Gossypol a été créé : l'apogossypol (Figure 26) (Kitada *et al.*, 2008). A partir de ce nouveau composé, d'autres dérivés ont été ultérieurement synthétisés et testés pour leurs propriétés anti-cancéreuses : en ajoutant des fonctions cétones à cet apogossypol par exemple, la molécule obtenue est l'apogossypolone (ApoG2 ; Figure 26) (Sun *et al.*, 2008). Un autre dérivé de l'apogossypol appelé BI-97C1 ou Sabutoclax (Figure 26) a permis d'obtenir de bons résultats en termes d'induction d'apoptose dans certaines cellules tumorales (Wei *et al.*, 2010). Ces différents dérivés du Gossypol sont actuellement en essais cliniques de phase I/II.

➤ L'Obatoclax

L'Obatoclax (GX015-070 ; Figure 26) se lie à Bcl-2, Bcl-X_L et Mcl-1 (Konopleva *et al.*, 2008) et permet d'induire l'apoptose dans différents types de cancers *in vitro*, lorsqu'il est utilisé seul [myélomes (Trudel *et al.*, 2007), cancer du poumon non à petite cellule (Li *et al.*, 2008), **cancers des VADS** (Yazbeck *et al.*, 2014), **cellules souches issues de glioblastomes** (Berghauser Pont *et al.* 2014)...] ou en association avec d'autres agents chimio-thérapeutiques [leucémies (Campàs *et al.*, 2006), lymphomes (Pérez-Galán *et al.*, 2007), cancer du poumon non à petite cellule (Li *et al.*, 2008), cancer du pancréas (Huang *et al.*, 2009a) ou mélanome (Jiang *et al.*, 2009)...]. L'avantage de l'Obatoclax est sa capacité à interagir avec Mcl-1, propriété qui ne possèdent pas l'ABT-737 ou l'ABT-263 (voir partie suivante) (Nguyen *et al.*, 2007). Cependant, l'affinité de l'Obatoclax avec les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 est plus faible que celle de l'ABT-737 (Shore & Viallet, 2005) et une résistance à l'Obatoclax a été observée lors de la phosphorylation de Bcl-2 *in vitro* (Pérez-Galán *et al.*, 2008).

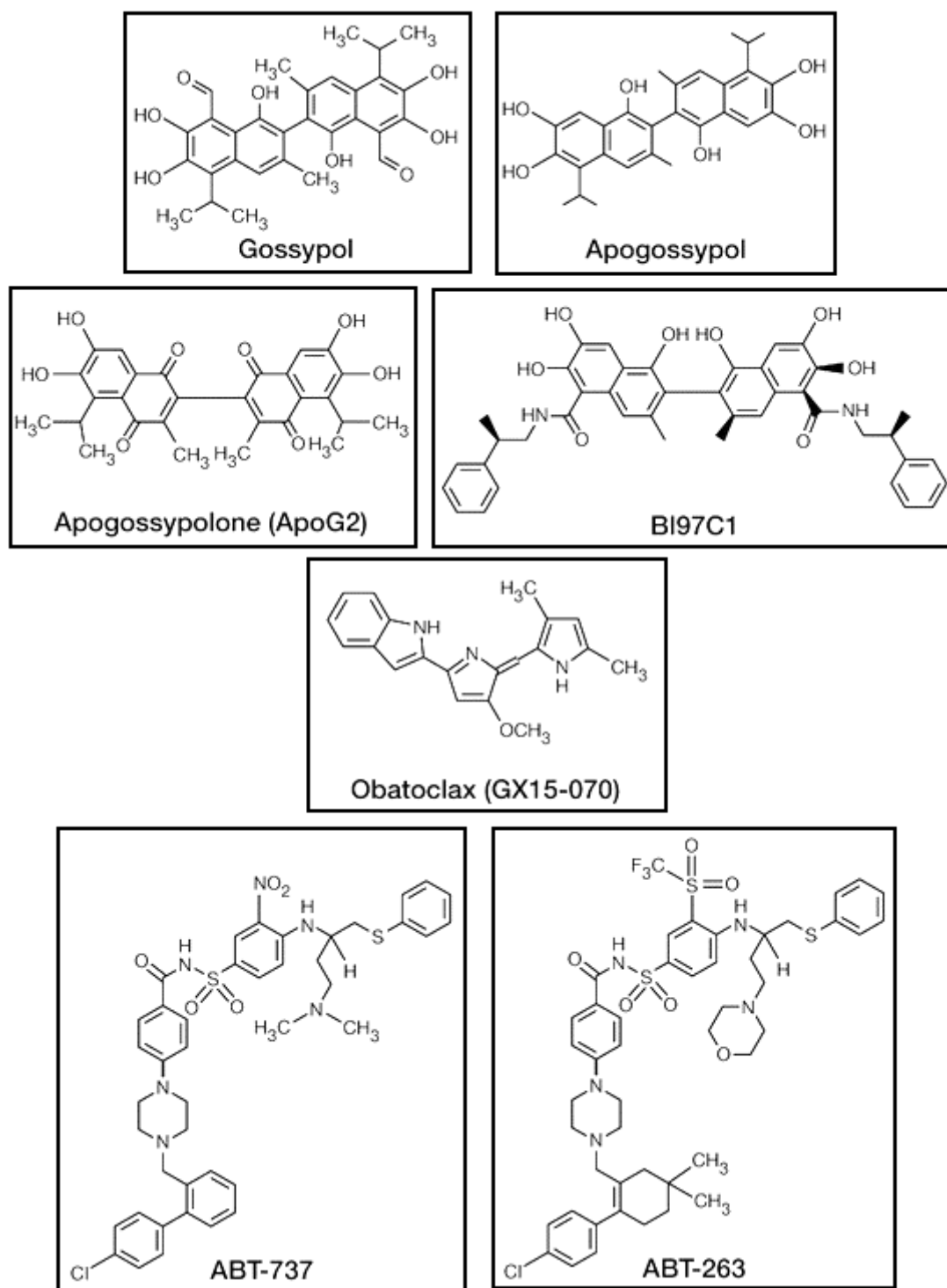


Figure 26 : Structure chimique de composés de la famille des BH3-mimétiques.

En outre, l'Obatoclax a été testé en étude clinique de phase I chez des patients atteints de cancers hématologiques ou myéloïdes, avec une bonne tolérance au traitement (Schimmer *et al.*, 2008 ; O'Brien *et al.*, 2009b). Malheureusement, des études cliniques de phase II n'ont

pas montré de meilleurs résultats avec l'Obatoclax qu'avec d'autres molécules (Parik *et al.*, 2010 ; Paik *et al.*, 2011 ; Oki *et al.*, 2012 ; Schimmer *et al.*, 2014 ; etc).

➤ L'ABT-737

L'ABT-737 (Laboratoires Abbott ; Figure 26) est le BH3-mimétique ayant fait l'objet du plus grand nombre d'études depuis sa commercialisation (Oltersdorf *et al.*, 2005). Son profil d'interaction est très proche de celui de Bad (Tableau 5), c'est-à-dire que l'ABT-737 possède une forte affinité pour les protéines Bcl-2, Bcl-X_L et Bcl-W, mais pas pour Mcl-1 et Bcl2A1 (Oltersdorf *et al.*, 2005). Ainsi, lors du traitement par **l'ABT-737 seul**, les protéines effectrices, Bax et Bak, ainsi que les protéines BH3-only sont libérées de leurs interactions avec Bcl-2, Bcl-X_L et Bcl-W (Chen *et al.*, 2007 ; Del Gaizo Moore *et al.*, 2007), mais conservent leur interaction avec Mcl-1 (Cragg *et al.*, 2008), empêchant l'entrée en apoptose lorsque Mcl-1 est très exprimée. En conséquence, bien que ce BH3-mimétique agisse sur de nombreuses cellules tumorales, comme dans le cancer du poumon à petites cellules (Hauck *et al.*, 2009) et les leucémies (Del Gaizo Moore *et al.*, 2007), certaines lignées cellulaires peuvent être résistantes selon leur niveau d'expression de Mcl-1 : plus une lignée exprime cette protéine anti-apoptotique, moins l'ABT-737 aura d'effet lorsqu'il est utilisé seul (van Delft *et al.*, 2006 ; Lin *et al.*, 2007). Afin d'augmenter la réponse à l'ABT-737 dans ces lignées, **la protéine Mcl-1 doit donc être inhibée à son tour**, soit par un inhibiteur spécifique comme l'Imatinib (Kuroda *et al.*, 2006) ou un *short hairpin*-RNA (Chen *et al.*, 2007) soit par une protéine BH3-only comme Bim (Cragg *et al.*, 2008) ou Noxa (Del Gaizo Moore *et al.*, 2007). De plus, il a été montré qu'un traitement prolongé des cellules issues d'un cancer du poumon à petites cellules par l'ABT-737 induit une résistance des cellules à cette molécule, en augmentant l'expression de Mcl-1 et en diminuant l'expression de Bcl-2 et de Noxa (Tahir *et al.*, 2007).

Parallèlement, il y existe également une corrélation entre la résistance à l'ABT-737 et l'expression de **Noxa** (Nakajima *et al.*, 2014). De plus, dans les cellules résistantes à l'ABT-737 et qui n'expriment pas Noxa, le retour de l'expression de cette protéine permet l'induction de l'apoptose (Nakajima *et al.*, 2014). Ceci peut s'expliquer par l'interaction entre Noxa et Mcl-1, qui est elle-même responsable de la résistance au composé (Nakajima *et al.*, 2014). Dans ce modèle, l'interaction de Mcl-1 avec Noxa induit leur translocation de la mitochondrie vers le cytosol, puis leur dégradation, celle de Noxa étant indépendante de l'ubiquitinylation, alors que celle de Mcl-1 dépend de son ubiquitinylation (Figure 27).

Type de cancer	Chimiothérapie / Radiothérapie	Référence
Cancers des VADS	Cisplatine, Etoposide	Li <i>et al.</i> , 2009
	Meayamycin B	Gao <i>et al.</i> , 2014
Cancers du poumon	Irradiation	Kim <i>et al.</i> , 2009c
	Paclitaxel	Oltersdorf <i>et al.</i> , 2005
	Gefitinib	Cragg <i>et al.</i> , 2007
	siRNA anti-Mcl-1	Lin <i>et al.</i> , 2007
		Tahir <i>et al.</i> , 2007
	Etoposide	Hann <i>et al.</i> , 2008
	Rapamycin	Gardner <i>et al.</i> , 2014
	Leucémies	Imatinib
Chen <i>et al.</i> , 2007		
Mak <i>et al.</i> , 2012		
Bortezomib	Chen <i>et al.</i> , 2014	
Lymphomes	Vorlinostat	Wiegmans <i>et al.</i> , 2011
		Matthews <i>et al.</i> , 2013
	Bortezomib	Touzeau <i>et al.</i> , 2011
Cancers hépatiques	Sorafenib	Galmiche <i>et al.</i> , 2010
	Cisplatine, Doxorubicin, Etoposide, Paclitaxel	Lieber <i>et al.</i> , 2010
	Cisplatine	Lieber <i>et al.</i> , 2013
Cancers de la prostate	Paclitaxel, Cisplatine	Bray <i>et al.</i> , 2009
	Docétaxel	Hao <i>et al.</i> , 2012c
		Tamaki <i>et al.</i> , 2014
Cancers du sein	Irradiation	Li <i>et al.</i> , 2012
		Wu <i>et al.</i> , 2014
	Cisplatine	Chen <i>et al.</i> , 2011a
Cancer cervical	Irradiation	Wang <i>et al.</i> , 2012b

Tableau 6 : Association de l'ABT-737 avec d'autres types de traitements chimiothérapeutiques ou radiothérapeutiques.

Enfin, l'expression de **Bim** est le troisième paramètre pouvant modifier la réponse cellulaire au traitement par l'ABT-737. En effet, une cellule tumorale exprimant Bim est sensible à l'ABT-737 seul, alors qu'une cellule ne l'exprimant pas est résistante (Lheureux *et al.*, 2015). Ceci s'explique par le fait que l'ABT-737 libère Bim de Bcl-2/Bcl-X_L, permettant à Bim soit de se lier à Mcl-1 soit d'activer Bax (Del Gaizo Moore *et al.*, 2007). Cependant, plusieurs études ont, au contraire, montré que seule l'expression de Noxa, et non Bim, permet d'annuler la résistance vis-à-vis de l'ABT-737 due à une surexpression de Mcl-1 (Zall *et al.*, 2010 ; Rooswinkel *et al.*, 2012).

Figure 27 : Action de l'ABT-737 et de Noxa dans les cellules cancéreuses résistantes à l'ABT-737 (d'après Nakajima *et al.*, 2014).

A. à l'état basal (sans Noxa, ni ABT-737) ; **B.** lors de l'expression de Noxa ; **C.** lors du traitement par l'ABT-737 ; **D.** lors de l'expression de Noxa et du traitement par l'ABT-737.

L'ABT-737 a également été largement utilisée étudié **en association avec d'autres thérapies**. De nombreux travaux ont montré que ce BH3-mimétique agit de façon synergique avec différents agents chimiothérapeutiques ou des thérapies ciblées ceci dans des types de cancers très variés (Tableau 6). Très peu d'études n'ont en revanche été entreprises en association avec les rayonnements ionisants. Concernant les **cancers des VADS**, l'ABT-737 n'a été étudié qu'en association avec le cisplatine (Li *et al.*, 2009), avec la Meayamycin B (Gao *et al.*, 2014), ainsi qu'avec un siARN dirigé contre Mcl-1 (Maji *et al.*, 2015) **mais jamais en association avec l'irradiation**. Li *et al.* (2009) ont montré que l'ABT-737 n'induit pas d'apoptose lorsqu'il est utilisé seul sur des lignées issues de cancers des VADS. Cependant, il agit de façon synergique avec le cisplatine en augmentant l'expression de Noxa après 12 heures de traitement et en diminuant l'expression de Mcl-1L 24h après traitement. Parallèlement, Gao *et al.* (2014) ont utilisé la Meayamycin B qui permet de modifier l'épissage de *MclI*, donc de diminuer l'expression de Mcl-1_L (anti-apoptotique) et ainsi d'augmenter l'expression de Mcl-1_S (pro-apoptotique). Cette molécule agit alors de façon synergique avec l'ABT-737 sur des lignées issues de cancers des VADS. Une étude très récente montre également que Mcl-1 doit être inhibée lors du traitement de lignées cellulaires issues de cancers des VADS afin que l'ABT-737 soit efficace (Maji *et al.*, 2015).

Peu de travaux portent sur l'association entre **l'irradiation** et l'ABT-737 (Tableau 6). Certains montrent une synergie thérapeutique grâce à cette association [cancer du poumon non à petites cellules (Kim *et al.*, 2009c) ; glioblastomes (Tagscherer *et al.*, 2012) ; cancer du sein (Wu *et al.*, 2014), cancer cervical (Wang *et al.*, 2012b)] avec une augmentation de l'apoptose, ainsi que de l'autophagie (Kim *et al.*, 2009c). Cependant, une autre étude a montré des résultats négatifs avec cette association dans le cancer du pancréas (Wei *et al.*, 2015). Li *et al.* (2012) ont également montré une absence d'effet sur une lignée issue d'un cancer du sein, bien que l'association augmente l'apoptose dans une lignée rendue radiorésistante artificiellement (dose totale de 50 Gy par fractions de 4 Gy sur 5 mois) et sur-exprimant Bcl-2 et Bcl-X_L. Cependant, il est dommage de noter l'absence de résultats concernant l'expression des autres protéines de la famille Bcl-2 dans cette étude.

Les cellules souches cancéreuses (CSC) peuvent également être ciblées par l'ABT-737 et induire leur mort. Dans les CSC issues du cancer du poumon ou du colon, cellules qui expriment fortement Bcl-X_L, l'ABT-737 induit la mort cellulaire, à la fois sur les cellules proliférant rapidement, les cellules quiescentes ou les cellules ayant une prolifération lente (Colak *et al.*, 2014 ; Zeuner *et al.*, 2014). Dans les CSC issues de glioblastome, l'ABT-737 utilisé seul n'a pas autant d'effet que sur les cellules non souches (Tagscherer *et al.*, 2008) mais il sensibilise ce type de cellules à différents agents chimiothérapeutiques (Pojo *et al.*, 2015).

Bien que l'ABT-737 présente des propriétés indéniables *in vitro*, il n'est pas utilisable sous cette forme en clinique du fait de sa faible solubilité dans les milieux aqueux. Pour pallier à ce problème, les laboratoires Abbott ont développé des analogues structuraux comme l'ABT-263 et l'ABT 199.

➤ L'ABT-263

Le dérivé de l'ABT-737, l'ABT-263 (Navitoclax ; Laboratoires Abott ; Figure 26), a pour avantage d'être disponible oralement et il possède à peu près le même profil d'interaction avec les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 que l'ABT-737 (Tse *et al.*, 2008).

Ainsi, les études *in vitro* et *in vivo* chez l'animal ont montré que l'ABT-263 exerce la même activité anti-tumorale que l'ABT-737, et ce, sur plusieurs types de cancers [cancer poumon à petite cellule (Tse *et al.*, 2008), leucémie (Tse *et al.*, 2008), chondrosarcome (Morii *et al.*, 2014), cancer de la prostate (Tamaki *et al.*, 2014)...]. De plus, l'expression de Bim dans les cellules les rend sensibles à l'ABT-263, à condition que Mcl-1 ne soit pas sur-exprimée

(Faber *et al.*, 2015). Cependant, aucune étude n'a pour l'instant été réalisée sur les cancers des VADS, ni en combinaison avec l'irradiation.

Plusieurs essais cliniques de phase I ont été initiés avec l'ABT-263. Cependant, des effets secondaires incluant systématiquement des anomalies hématologiques ont été rapportés, effets secondaires réversibles après arrêt du traitement (thrombocytopénie, neutropénie et anémie). D'autres effets comme l'augmentation des enzymes hépatiques (alanine aminotransférase et aspartate aminotransférase) et des désordres intestinaux (diarrhée, nausées, vomissements) (Tse *et al.*, 2008 ; Cleary *et al.*, 2014 ; Vlahovic *et al.*, 2014) ont également été décrits. Cependant, son efficacité est avérée comme en témoignent certaines études réalisées en association avec d'autres molécules chimiothérapeutiques (Wilson *et al.*, 2010 ; Gandhi *et al.*, 2011).

Malgré ces effets secondaires, des études cliniques de phase II ont également été réalisées. Utilisé seul, l'ABT-263 semble avoir une activité limitée en tant qu'agent chimiothérapeutique (Rudin *et al.*, 2012 ; Kipps *et al.*, 2015) alors que son association avec d'autres agents chimiothérapeutiques comme le Rituximab (anticorps anti-CD20) dans les leucémies lymphoïdes chroniques ont donné des résultats extrêmement prometteurs (Kipps *et al.*, 2015).

➤ L'ABT-199

L'ABT-199 est quant à lui un dérivé de l'ABT-263 qui a été développé afin de diminuer les thrombocytopénies observées avec l'ABT-263 et d'améliorer l'efficacité clinique du composé chimio-thérapeutique (Souers *et al.*, 2013). Cependant, l'ABT-199 n'a pas la même affinité pour les protéines anti-apoptotiques que des deux autres molécules précédemment synthétisées puisqu'elle interagit uniquement avec Bcl-2, mais pas avec Bcl-X_L, protéine essentielle dans la survie des plaquettes (Schoenwaelder *et al.*, 2011 ; Schoenwaelder & Jackson, 2012). C'est ce qui permet d'avoir une molécule efficace pour induire l'apoptose dans les cellules leucémiques, sans entraîner de thrombocytopénie (Vandenberg & Cory, 2013).

Cependant, là encore, des résultats hétérogènes ont été observés selon le type de cancer étudié. En effet, l'ABT-199 induit l'apoptose dans les cancers du sein (Vaillant *et al.*, 2013) et dans les leucémies (Pan *et al.*, 2014 ; Khaw *et al.*, 2014). Cependant, en raison de la forte spécificité de l'ABT-199 pour Bcl-2, cette molécule n'est pas efficace pour induire la mort cellulaire dans les cellules tumorales surexprimant Bcl-X_L. C'est le cas, entre autres, des

cellules souches issues du cancer du poumon ou du colon (Colak *et al.*, 2014 ; Zeuner *et al.*, 2014).

Chapitre V – Les cellules souches cancéreuses

1. Les cellules souches cancéreuses

1.1. Les cellules souches normales

Les cellules souches (CS) sont des cellules indifférenciées capables d'auto-renouvellement et qui peuvent donner naissance à un ou plusieurs types de cellules différenciées pendant un temps très long, voire illimité (Weissman, 2000). Il existe deux types de CS : les CS embryonnaires et les CS adultes.

Lors de l'embryogénèse (Figure 28), l'ovocyte fertilisé est composé de cellules souches **totipotentes** (cellules capables de se différencier en n'importe quelle cellule spécialisée et de donner un individu complet) qui vont se diviser jusqu'à former un petit amas de cellules, appelé la morula. Ensuite, la morula évolue en blastocyste et les CS deviennent **pluripotentes**, c'est-à-dire qu'elles peuvent se différencier en cellules germinales, en cellules du trophoctoderme (couche cellulaire externe) ou en un des trois feuillets embryonnaires : l'ectoderme, le mésoderme ou l'endoderme. Ces CS pluripotentes sont les CS embryonnaires. Après le stade de blastocyste, l'embryon commence la gastrulation et les cellules engagées dans un type de feuillet embryonnaires vont se différencier et deviennent alors **multipotentes** : elles sont capables de se différencier en plusieurs types cellulaires correspondant au feuillet embryonnaire à laquelle elles appartiennent. Des cellules multipotentes sont à la fois présentes dans l'embryon et dans l'organisme adulte. Par exemple, les cellules hématopoïétiques sont des CS multipotentes car elles peuvent à la fois former des globules rouges, des plaquettes, des lymphocytes T et B et des macrophages. Par contre elles ne peuvent pas donner des cellules d'autres types. Enfin, les CS se différencient pour former des CS **unipotentes**, ne pouvant produire qu'un seul type cellulaire.

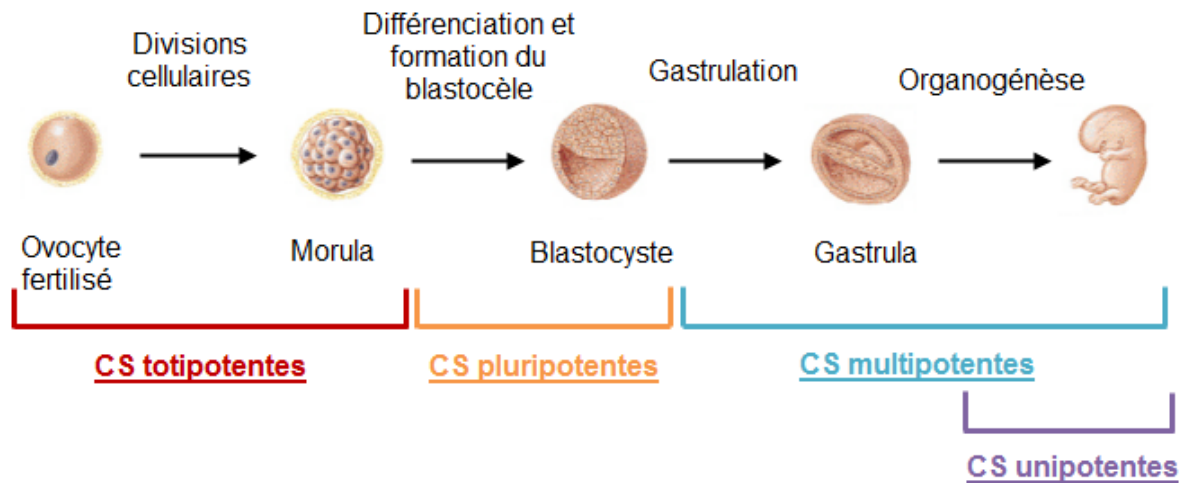


Figure 28 : Stades de l'embryogénèse et le type de cellules souches associées.

Une fois que l'ovocyte est fertilisé, les cellules se divisent par mitose jusqu'à former la morula. La division cellulaire se poursuit en parallèle de la différenciation des CS totipotentes en CS pluripotentes. De plus, une cavité appelée blastocèle apparaît, transformant la morula en blastocyste. Lors de la gastrulation, la différenciation des CS se poursuit en faisant apparaître des CS multipotentes. Ces cellules sont différenciées en cellules germinales ou en cellules des feuilletés embryonnaires. Enfin, l'organogénèse commence avec l'apparition de CS unipotentes.

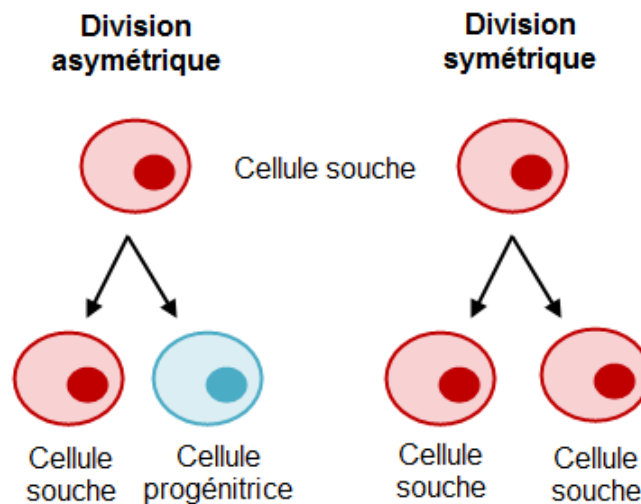


Figure 29 : Différentes divisions cellulaires d'une cellule souche.

Les CS adultes sont multipotentes et constituent une très faible proportion des cellules composant un tissu. Chaque CS adulte exprime des marqueurs spécifiques du tissu dans lequel elle se trouve. Par exemple, les CS adultes mésenchymateuses issues de la moelle osseuse

expriment les marqueurs membranaires CD271 et CD146, alors que les CS adultes mésenchymateuses issues des tissus adipeux expriment les marqueurs membranaires CD29 et CD105 (Alvarez *et al.*, 2012). De plus, les CS adultes se divisent lentement mais peuvent augmenter leur vitesse de prolifération en fonction de certains stimuli (Cheung & Rando, 2013). Les CS ont deux fonctions : le maintien de la sous-population des CS par l'auto-renouvellement et le maintien de la population principale du tissu concerné par leur capacité de différenciation. Ainsi, les CS peuvent se diviser de façon symétrique ou asymétrique (Figure 29). Lors de la **division symétrique**, il y a formation de deux CS identiques à la CS initiale : ceci permet la croissance de la sous-population des CS, notamment après une lésion tissulaire importante (Morrison & Kimble, 2006). La division asymétrique permet de former une nouvelle CS et une cellule progénitrice ayant un fort potentiel prolifératif et qui s'engage dans une voie de différenciation (Berika *et al.*, 2014).

La capacité d'auto-renouvellement des CS est assurée à la fois par :

- Le maintien d'une activité **télomérase** : comme dans les cellules germinales, les CS possèdent une télomérase permettant d'empêcher la diminution de la taille des télomères localisés aux extrémités des chromosomes. Ceci permet à ces cellules de ne pas entrer en sénescence et de maintenir le caractère « souche » (Brennan *et al.*, 2010).
- **L'inhibition de l'apoptose** : les CS surexpriment la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Domen & Weissman, 2000) et activent des voies de signalisation pro-survie, telles que la voie NFκB et la voie PI3K/AKT (Tsiftoglou *et al.*, 2009).
- **L'activation de la prolifération** via différentes voies de signalisation (voir partie V.1.3.).

Les CS sont localisées dans un microenvironnement cellulaire dynamique et spécifique afin de maintenir leur survie et leur protection : ce microenvironnement est appelé une « **niche** ». La niche régule le comportement des CS entre l'état de quiescence, l'auto-renouvellement et la différenciation (Morrison & Spradling, 2008) et les protège également des mutations génétiques pouvant mener à une transformation en cellules cancéreuses (Greco & Guo, 2010). Les CS interagissent avec des cellules stromales par l'intermédiaire des récepteurs de surface et des différentes jonctions, ainsi qu'avec les molécules de la matrice extracellulaire (MEC). Cependant, la composition exacte des niches dépend du type tissulaire étudié. L'aspect dynamique de ces interactions se fait de la niche vers la CS, modifiant alors le

comportement de celle-ci, mais la CS peut également influencer la composition de la MEC en sécrétant des molécules en réponse à un signal (Kurtz & Oh, 2012).

1.2. La théorie des cellules souches cancéreuses

L'hypothèse de l'origine et la progression tumorale a longtemps été expliqué par le modèle appelé modèle « **stochastique** » (Figure 30). Dans ce modèle, toutes les cellules tumorales ont la même capacité proliférative élevée, avec des mécanismes d'auto-renouvellement et de différenciation aléatoires (Nowell, 1976). Ainsi, selon le modèle stochastique, l'hétérogénéité tumorale résulte de mutations aléatoires et est donc attribuée à la différenciation, à des variations génétiques et épigénétiques et à l'influence du microenvironnement cellulaire. De plus, ce modèle précise également la possibilité d'une dédifférenciation des cellules tumorales.

Cependant, la majorité des cellules cancéreuses est incapable de former une tumeur *de novo*. Les cellules présentant cette capacité ont des propriétés similaires aux CS (Lapidot *et al.*, 1994), faisant naître un nouveau modèle, appelé modèle « **hiérarchique** » ou hypothèse des cellules souches cancéreuses (CSC) (Figure 30). Selon ce modèle, une tumeur provient de la transformation de cellules initiatrices présentant les mêmes caractéristiques que les cellules souches et qui se développe de manière organisée. L'hétérogénéité tumorale résulte ici d'un arrêt à différents stades de la différenciation cellulaire. Ainsi, d'après cette théorie, les tumeurs ont la même hiérarchie qu'un tissu normal, avec des CSC ayant la capacité d'auto-renouvellement et de générer des cellules progénitrices. Ces dernières sont des cellules d'amplification transitoire capables de se diviser et de se différencier en cellules tumorales spécialisées.

Cependant, l'origine elle-même des CSC est également controversée. La première hypothèse veut que les CSC résultent de la transformation maligne d'une CS adulte (Huntly & Gilliland, 2005 ; Schepers *et al.*, 2012) ; la deuxième hypothèse dit que la formation des CSC résulte de l'acquisition de la capacité d'auto-renouvellement d'une cellule différenciée à la suite d'accumulation de mutations génétiques (Krivtsov *et al.*, 2006).

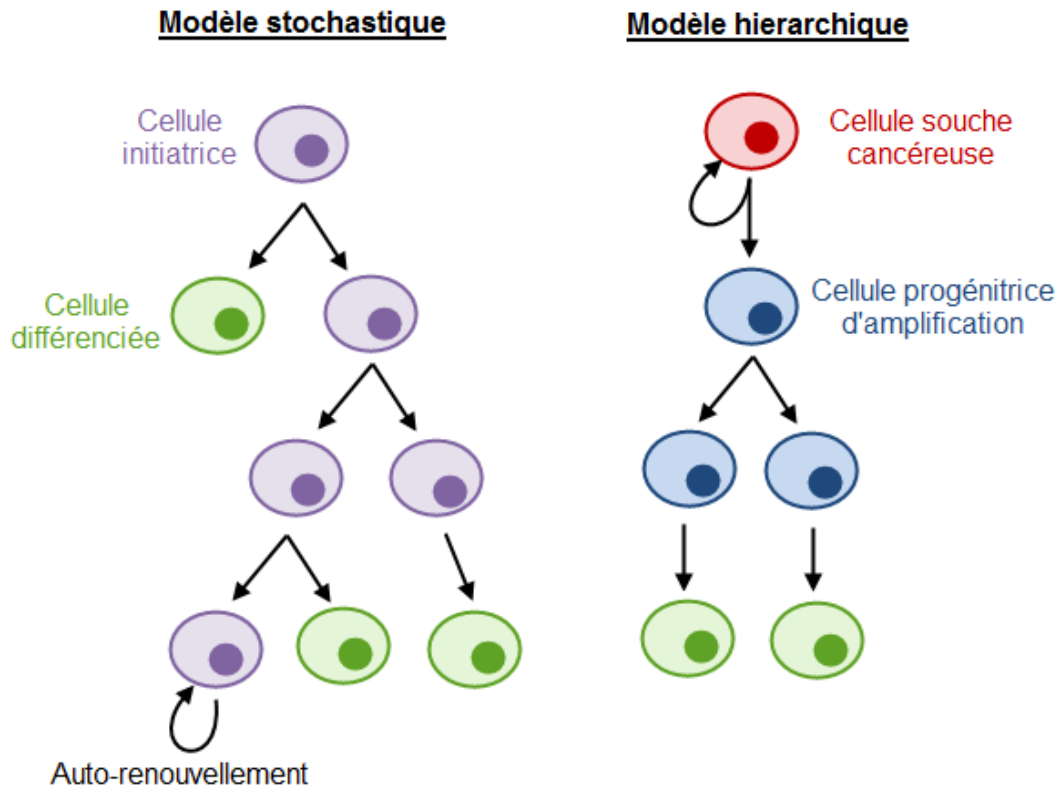


Figure 30 : Représentation des modèles de la transformation tumorale.

Les cellules souches cancéreuses (CSC) ont des **caractéristiques** similaires aux CS normales, comme l'auto-renouvellement, leur potentiel de prolifération et de différenciation. De plus, la sous-population de CSC est présente en très faible proportion dans les tumeurs, tout comme les CS normales dans les organes (Lapidot *et al.*, 1994). En outre, les propriétés précédemment citées pour les CS normales sont attribuables aux CSC, comme l'expression de la télomérase, l'inhibition de l'apoptose et l'activation de la prolifération (Ginestier *et al.*, 2007a). Cependant, les CSC présentent des caractéristiques propres aux cellules tumorales que les CS normales n'ont pas. En effet, les CSC montrent une prolifération anarchique en raison des dysfonctionnements dans l'auto-renouvellement et d'une différenciation anormale.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les tumeurs possèdent une organisation similaire à celle d'un tissu sain. Dans ces conditions, il existe également des **niches** au sein des tumeurs qui renfermeraient les CSC (Borovski *et al.*, 2011). Ces niches sont importantes pour le maintien des CSC au sein de la tumeur et jouent un rôle important dans la résistance aux traitements (Morrison & Spradling, 2008). De plus, la taille et le nombre des niches présentes

dans une tumeur est en étroite corrélation avec l'expansion tumorale (Zhu *et al.*, 2011). Cependant, comme pour les tissus sains, la composition des niches présentes dans les tumeurs est très complexe et est différente pour chaque type de cancer. En outre, il existe une relation entre la faible vascularisation d'une partie de la tumeur et la présence des CSC. En effet, les zones faiblement vascularisées sont hypoxiques et les cellules présentes dans ces zones expriment plusieurs marqueurs d'hypoxie, tels que HIF-1 α , CAIX (*Carbonic Anhydrase type IX*) et VEGF (Persano *et al.*, 2011). De plus, ces cellules présentant des marqueurs des CSC sont retrouvées dans ces niches (Persano *et al.*, 2011).

1.3. La transition épithélio-mésenchymateuse

Dans les tissus sains, la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est l'ensemble du processus qui a lieu au cours de la cicatrisation des plaies. Elle correspond à l'acquisition par les cellules épithéliales d'un phénotype migratoire habituellement observé dans les cellules mésenchymateuses (Singh & Settleman, 2010). Dans les cancers, certaines cellules sont également capables de réaliser cette TEM en modifiant l'expression de certains gènes responsables de la rupture des contacts cellulaires et la migration, phénomènes aboutissant à des métastases (Chen *et al.*, 2011b). Le processus métastatique commence par la TEM de quelques cellules au niveau du site primaire de la tumeur (Figure 31). Ces cellules sont alors capables de migrer à travers la membrane basale par invasion pour atteindre les vaisseaux lymphatiques ou vasculaires (intravasation) dans le but de coloniser un site plus ou moins éloigné (dissémination et extravasation). La cellule peut alors réaliser le processus inverse à la TEM, appelé la transition mésenchymo-épithéliale (TME) dans le but de coloniser ce second site et de former une tumeur secondaire.

Au niveau phénotypique, la TEM se caractérise par une perte fonctionnelle des protéines d'adhérence, telle qu'une diminution d'expression de la E-cadhérine (Peinado *et al.*, 2004) ou l'accumulation nucléaire et cytoplasmique de la β -caténine (Kim *et al.*, 2002b). Parallèlement, la cellule en cours de TEM augmente sa production de métalloprotéases permettant de dégrader la MEC, phénomène nécessaire à la migration et à l'invasion (Clarke *et al.*, 2014). Enfin, une réorganisation du cytosquelette dans la cellule lui permet de perdre sa polarité baso-apicale, bien que cette propriété ne soit pas suffisante à elle seule pour induire la TEM (McLane *et al.*, 2014).

Les TEM sont régulées par le micro-environnement cellulaire : plusieurs facteurs de croissance ainsi que des cytokines induisent l'invasion des cellules cancéreuses et la formation des métastases. Par exemple, Twist, Snail-1, Snail-2, ZEB-1 et ZEB-2 induisent la TEM en réprimant la transcription de la E-cadhérine, qui est un des marqueurs de la TEM (Cano *et al.*, 2000 ; Comijn *et al.*, 2001 ; Hajra *et al.*, 2002 ; Eger *et al.*, 2005 ; Casas *et al.*, 2011). Il en va de même lors de la TME pendant laquelle la cellule, grâce à certains signaux externes (BMP-7, FGF-1, -3, -7, Wnt-4), est capable de retrouver un phénotype épithélial (van der Pluijm, 2011).

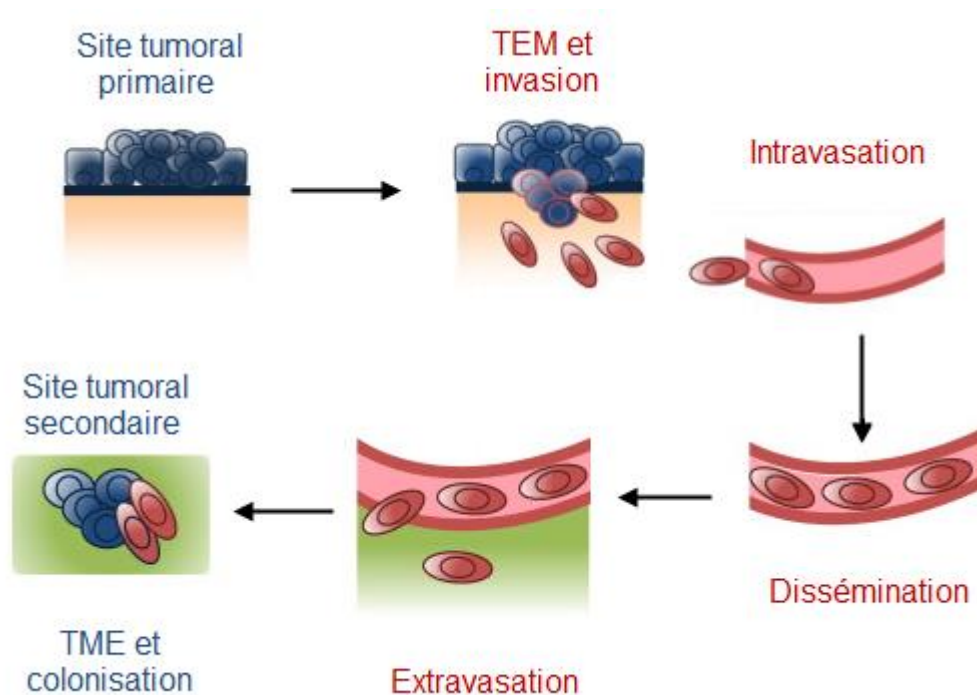


Figure 31 : Processus métastatique (d'après Scheel & Weinberg, 2012).

Enfin, les cellules métastatiques possèdent des caractéristiques de CSC, notamment au niveau de l'expression des marqueurs de surface et de l'ALDH. Dans les cancers des VADS, l'expression des récepteurs CD44 et CD133 est caractéristique des CSC (voir partie V.2.2.). Ces phénotypes, ainsi que l'expression de l'ALDH, sont retrouvés dans les cellules ayant un potentiel invasif important (Chen *et al.*, 2011b ; Chen *et al.*, 2011c ; Biddle *et al.*, 2011). De plus, sous l'influence de la protéine Snail, une lignée cellulaire issue des cancers des VADS

acquiert à la fois des caractéristiques de CSC et augmente son pouvoir invasif et migratoire (Masui *et al.*, 2014).

1.4. Les principales voies de signalisation spécifiques des CSC

Comme on retrouve des propriétés similaires entre les CS normales et les CSC, il est logique d'avoir des voies de signalisation communes capables de réguler les capacités d'auto-renouvellement des CS normales et des CSC. De plus, des signatures moléculaires récurrentes sont retrouvées dans les CSC issues de différents types de tumeurs, avec des mutations accumulées pouvant activer de façon inappropriée les voies de l'auto-renouvellement (Adolphe *et al.*, 2004).

1.4.1. L'hypoxie

Les cellules cancéreuses se multiplient plus rapidement que le réseau vasculaire associé entraînant ainsi la présence de zones non vascularisées au sein de la tumeur, caractérisées par un faible apport en oxygène et en nutriments. Les cellules cancéreuses présentes dans ces zones hypoxiques augmentent l'expression des facteurs de transcriptions HIF (*Hypoxia Inducible Factors*) qui sont des régulateurs, entre autres, de la prolifération, de l'angiogénèse, des métastases et du métabolisme (Louie *et al.*, 2010). Ces cellules ont alors un phénotype plus agressif et une résistance aux traitements accrue (Rohwer & Cramer, 2011), ce qui peut expliquer un pronostic défavorable chez le patient (Hoogsteen *et al.*, 2007).

Parallèlement, il existe un lien entre l'hypoxie et le maintien des CSC, avec une augmentation des caractéristiques souches en conditions hypoxiques (Seidel *et al.*, 2010 ; Oliveira-Costa *et al.*, 2011). En effet, HIF-1 α interagit avec la protéine Notch (voir partie V.1.4.2.), et maintient ainsi des caractéristiques indifférenciées des cellules (Gustafsson *et al.*, 2005). De plus, HIF-1 α active également le facteur de transcription STAT3, ce qui a pour conséquences d'inhiber l'apoptose et la différenciation (Nishimoto *et al.*, 2014).

1.4.2. Notch

Notch est une glycoprotéine transmembranaire impliquée dans la communication intercellulaire et qui peut être activée par différents ligands [Dll-1 (*Delta-like ligand-1*) Dll-3, Dll-4, Jag-1 (*Jagged-1*) et Jag-2]. Le domaine intracellulaire de Notch (NICD, *Notch Intra Cellular Domain*) est alors clivé par la γ -sécrétase, puis transloqué vers le noyau afin d'activer la transcription de certains gènes à l'aide d'autres co-activateurs. Ces gènes régulés par

l'expression de Notch sont, entre autres, impliqués dans la prolifération, l'apoptose, la différenciation et la division asymétrique des CS normales (Koch *et al.*, 2013) et des CSC (Capaccione & Pine, 2013).

Une dérégulation de la voie de signalisation de Notch participe à la carcinogénèse (Allen *et al.*, 2011) mais le lien avec la division asymétrique reste encore inexpliqué. L'activation de cette voie de signalisation est associée aux CSC dans divers types de cancers, tels que le glioblastome (Fan *et al.*, 2010), le cancer du sein (Harrison *et al.*, 2010) et les cancers des VADS où elle participe à l'angiogénèse (Wang *et al.*, 2015).

1.4.3. Sox2, Oct4 et Nanog

Sox2, Oct4 et Nanog sont des facteurs de transcription nécessaires à l'auto-renouvellement des CS normales (Molofsky *et al.*, 2004). Ils permettent d'activer les gènes de l'auto-renouvellement et de réprimer les gènes de la différenciation. L'expression de ces trois facteurs de transcription doit être stable et la modification de l'expression d'un des trois provoque une rupture des boucles de rétrocontrôles positifs et négatifs, menant à la différenciation cellulaire (Niwa *et al.*, 2000).

De plus, ces facteurs de transcription sont retrouvés dans les CSC issues de différents types de cancers solides (Leung *et al.*, 2010 ; Cheung *et al.*, 2011 ; Leis *et al.*, 2012), incluant les cancers des VADS (Bourguignon *et al.*, 2012). Sox2, Oct4 et Nanog jouent donc un rôle important dans le maintien et la prolifération des CSC au sein des tumeurs.

1.4.4. Sonic Hedgehog

La voie de signalisation Hedgehog est impliquée dans la survie, la prolifération et l'angiogénèse des CS normales et des CSC (Katoh & Katoh, 2009). Cette voie peut être activée par trois ligands différents : *Sonic Hedgehog* (Shh), *Indian Hedgehog* (Ihh) et *Desert Hedgehog* (Dhh). La voie Shh est la voie impliquée dans le maintien des CSC indifférenciées dans les niches cellulaires et régule leur prolifération (Bar *et al.*, 2007). Le récepteur de ce ligand est Ptch (*Patched*) qui, en absence de ligand, est associé et inhibe les protéines Smo (*Smoothened*). En revanche, en présence d'un ligand, cette inhibition est levée et la protéine Smo peut activer des facteurs de transcription comme Gli (Rohatgi *et al.*, 2007).

En outre, une surexpression des protéines impliquées dans cette voie de signalisation (Gli1, Shh) est observée dans de nombreux cancers, incluant ceux des VADS (Dimitrova *et al.*,

2013). Cette sur-activation est associée à un mauvais pronostic, au pouvoir métastatique des cellules et à leur radorésistance (Wang *et al.*, 2012c ; Gan *et al.*, 2014).

1.4.5. *Bmi-1*

Bmi-1 est un facteur de transcription majoritairement impliqué dans l'auto-renouvellement des CS (Park *et al.*, 2003), ainsi que dans la prolifération et la survie cellulaire (Grinstein & Wernet, 2007). Cette protéine est une cible de différentes voies de signalisation, dont la voie Hedgehog précédemment décrite, qui active sa transcription et augmente ainsi son expression (Liu *et al.*, 2006).

D'un point de vue mécanistique, Bmi-1 active la sous-unité catalytique de la télomérase hTERT, induisant l'immortalisation des cellules et favorisant la TEM (Qiao *et al.*, 2013). De plus, cette protéine inhibe p16^{INK4A} et p14^{ARF} qui régulent le cycle cellulaire et l'entrée en apoptose (Liu *et al.*, 2012). Enfin, Bmi-1 régule également l'apoptose en inhibant l'expression de la protéine pro-apoptotique Bim (Jagani *et al.*, 2010).

Bmi-1 est surexprimée dans plusieurs types de cancers, dont les cancers des VADS (Vormittag *et al.*, 2009) et est associée à un mauvais pronostic. De plus, l'expression de Bmi-1 est corrélée à l'expression de marqueurs de CSC (Tabor *et al.*, 2011), ainsi qu'avec la radorésistance des CSC dans les cancers des VADS (Xu *et al.*, 2014b).

1.4.6. *Wnt/β-caténine*

Wnt et la β-caténine sont impliquées dans la régulation de l'homéostasie et de l'auto-renouvellement, en régulant la division symétrique des CS (Klaus & Birchmeier, 2008). La voie Wnt peut être décomposée en trois voies différentes : la voie canonique Wnt/β-caténine, la voie de polarité cellulaire planaire agissant sur le cytosquelette et la forme de la cellule (Wang & Nathans, 2007) et la voie Wnt/calcium (Kohn & Moon, 2005). La famille Wnt est composée de 19 glycoprotéines sécrétées hors de la cellule où elles sont associées à un récepteur transmembranaires de la famille Fz (*Frizzled*) et à un deuxième récepteur, LDLR (*Low Density Lipoprotein Receptor*) (Schulte, 2015). L'association entre une protéine Wnt et un récepteur Fz permet de recruter une troisième protéine, Dishevelled, qui va permettre la dissociation du complexe GSK-3β/APC/Axine (Fagotto *et al.*, 1999), complexe impliqué dans la voie canonique de Wnt. Lorsqu'il est assemblé, ce complexe phosphoryle la β-caténine, afin qu'elle soit dégradée. Ainsi, lorsque le complexe GSK-3β/APC/Axine est dissocié, la β-caténine

s'accumule dans le cytoplasme, puis est transloquée vers le noyau où elle active la transcription de certains gènes cibles (Huber *et al.*, 1996) en interagissant avec d'autres facteurs de transcriptions qui jouent un rôle important dans les CS (Saegusa *et al.*, 2012 ; Faunes *et al.*, 2013).

Une activation aberrante de la voie Wnt/ β -caténine a été mise en évidence dans plusieurs types de cancers (Klaus & Birchmeier, 2008). De plus, cette voie de signalisation est liée aux propriétés particulières des CSC, comme l'expression de la télomérase (Hoffmeyer *et al.*, 2012), le processus de TEM et l'auto-renouvellement (DiMeo *et al.*, 2009). En outre, certaines gènes cibles de la β -caténine sont impliqués dans l'invasion et la migration [fibronectine (Gradl *et al.*, 1999), CD44 (Uchino *et al.*, 2010)...].

Au sein des cancers des VADS, la surexpression des protéines de la voie Wnt/ β -caténine est associée à une augmentation de l'invasion mais également de la survie (Yang *et al.*, 2006), en inhibant l'apoptose mais pas l'autophagie (Chang *et al.*, 2013b). Cette activation de la voie Wnt/ β -caténine a été décrite également dans une sous-population (Song *et al.*, 2010) surexprimant les transporteurs ABCG2, marqueur des CSC, ce qui contribue à la chimiorésistance cellulaire (Guan *et al.*, 2015). Enfin, il a été montré que le traitement de CSC issues de cancers des VADS par un inhibiteur de la voie Wnt permet de diminuer l'auto-renouvellement et la TEM de ces cellules (Warrier *et al.*, 2014).

2. Biomarqueurs des CSC dans les cancers des VADS

Les CSC forment une sous-population cellulaire délicate à isoler. Plusieurs méthodes d'enrichissement peuvent être utilisées. Tout d'abord, les CSC peuvent être enrichies en identifiant les cellules de la SP (*Side Population*). Parallèlement, l'utilisation, seule ou en association, de marqueurs membranaires ou intracellulaires caractéristiques des cellules souches est également largement utilisée.

2.1. Isolement de la *Side Population*

La *Side Population* (SP) est une sous-population tumorale exprimant des pompes à efflux, de type transporteur ABC (*ATP-Binding Cassette*) et ayant des caractéristiques de CS (Goodell *et al.*, 1996). Ces transporteurs donnent à la cellule la capacité d'exclure les agents chimiothérapeutiques et certains colorants vitaux, tel que le Hoechst 33342. Ce colorant se fixe au niveau de l'ADN et peut être excité par une lumière de longueur d'onde de 350 nm, pour

emmètre à un maximum de 461 nm. Lorsqu'une population cellulaire est mise en contact avec le Hoechst 33342, la sous-population de CS est capable de l'exclure grâce aux transporteurs ABC et aucune fluorescence n'est donc émise. Cette propriété peut donc être exploitée en cytométrie de flux afin de séparer cette sous-population.

Dans les cancers des VADS, la SP représente entre 0,2 et 3 % de la population tumorale initiale et présente des caractéristiques de CSC, telles que l'augmentation de la résistance aux traitements, l'expression de gènes impliqués dans l'auto-renouvellement et sont capables de produire des tumeurs après xenogreffe (Tabor *et al.*, 2011 ; Wu *et al.*, 2013 ; Guan *et al.*, 2014).

2.2. Les marqueurs de surface

2.2.1. CD44

Le récepteur de surface CD44 est une glycoprotéine impliquée dans les interactions cellule-cellule ainsi que dans l'adhésion et la migration cellulaires. Ce marqueur est surexprimé dans les CSC issues de plusieurs types de cancers (Sillanpää *et al.*, 2003 ; Sheridan *et al.*, 2006 ; Patrawala *et al.*, 2006), dont ceux des VADS (Prince *et al.*, 2007). Dans ces derniers, l'expression du récepteur CD44 est associée à un faible taux de survie des patients (Staibano *et al.*, 2007) ainsi qu'à une récurrence locale (de Jong *et al.*, 2010).

En outre, les cellules tumorales issues de cancers des VADS sur-exprimant CD44 possèdent des propriétés de CSC telles qu'un fort potentiel prolifératif, une résistance à l'apoptose (Chikamatsu *et al.*, 2012) ainsi qu'une capacité à induire des tumeurs à partir d'un petit nombre de cellules (Prince *et al.*, 2007) et à former des métastases *in vivo* (Davis *et al.*, 2010). De ce fait, le tri des cellules sur-exprimant ce récepteur est maintenant couramment utilisé afin de sélectionner des CSC issues de cancers des VADS.

2.2.2. CD133

La glycoprotéine transmembranaire CD133, aussi appelée prominine, est exprimée dans les CS normales (Corbeil *et al.*, 2000) ainsi que dans les CSC issues de différents types de cancers (Singh *et al.*, 2003 ; Tirino *et al.*, 2008) dont les cancers des VADS (Zhou *et al.*, 2007). Cependant, la première étude publiée à ce sujet portait sur la lignée Hep-2, lignée cellulaire issue d'un carcinome du larynx connue pour être contaminée par des cellules HeLa issues d'un adénocarcinome cervical (Nelson-Rees *et al.*, 1981 ; Chen, 1988), ce qui remet en cause les résultats obtenus dans cette étude. D'autres études ont également montré l'implication des

cellules CD133+ dans la résistance aux agents chimiothérapeutiques, mais c'est la même lignée cellulaire a été utilisée (Yang *et al.*, 2011b ; Wanng *et al.*, 2011).

Cependant, la surexpression du marqueur de surface CD133 permet d'augmenter les caractéristiques souches de lignées de cancers des VADS, avec une augmentation de la SP et de la capacité à former des tumorisphères, une surexpression d'Oct-4 et Nanog ainsi qu'une tumorigénicité accrue (Chen *et al.*, 2011d). De ce fait, le rôle de ce marqueur dans les cancers des VADS requiert des travaux complémentaires afin de conclure sur sa significativité comme marqueur des CSC dans les VADS.

2.3. L'Aldéhyde Déshydrogénase

La famille de l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH), dont l'ALDH1 fait partie, est une famille d'enzymes cytosoliques capables de transformer les aldéhydes en acides carboxyliques par une réaction d'oxydation. Une importante activité de l'ALDH a été rapportée dans les CS normales (Armstrong *et al.*, 2004 ; Corti *et al.*, 2006) ainsi que dans les CSC (Ginestier *et al.*, 2007b ; Huang *et al.*, 2009b), dont les cancers des VADS (Chen *et al.*, 2009). De plus, la sous-population cellulaire isolée grâce à ce marqueur est capable de former des tumeurs *in vivo* à partir d'un très faible nombre de cellules (Clay *et al.*, 2010) avec un fort potentiel invasif (Chiou *et al.*, 2011).

Cependant, il faut signaler que des résultats contradictoires ont été rapportés concernant la survie des patients atteints de cancers des VADS. En effet, le devenir des patients peut à la fois être corrélé à l'expression positive de l'ALDH1 (Chen *et al.*, 2009) mais également à la faible expression de celle-ci (Koukourakis *et al.*, 2012). De ce fait, ce marqueur est souvent associé à un deuxième, généralement le CD44, afin d'isoler la sous-population de CSC dans les cancers des VADS (Chinn *et al.*, 2014 ; Nör *et al.*, 2014).

3. Les origines potentielles de résistance des CSC aux traitements

La résistance des CSC aux traitements conventionnels des cancers, à savoir radio- et chimiothérapie, est un problème majeur dont découlent les rechutes après traitement. Cette résistance résulte de plusieurs caractéristiques propres aux CSC comme la surexpression des transporteurs ABC, l'augmentation de la capacité à réparer l'ADN, la résistance à l'apoptose, l'expression d'agents antioxydants, l'environnement hypoxique, l'état de quiescence et la capacité d'auto-renouvellement.

3.1. L'efflux des agents chimio-thérapeutiques

Les transporteurs ABC cités précédemment sont à l'origine de l'exclusion des agents chimiothérapeutiques hors des CS normales et des CSC (Moitra *et al.*, 2011), plus particulièrement les transporteurs MDR1 (*Multidrug Resistance Transporter 1*) et ABCG2 (*ATP Binding Cassette type G2*) (Tabor *et al.*, 2011). Ainsi, l'utilisation de Vérapamil, un inhibiteur de ces transporteurs ABC, permet de sensibiliser les cellules à différents agents chimiothérapeutiques (Moitra *et al.*, 2011).

3.2. La réparation des dommages à l'ADN

Les effets létaux des radiations ionisantes et de certains agents chimiothérapeutiques résident dans leur capacité à induire des dommages à l'ADN (voir partie III.1.), avec des lésions létales et des lésions sub-létales. La réparation des lésions à l'ADN sub-létales induites par des radiations ionisantes est accélérée dans les CSC (Bao *et al.*, 2006), ce qui explique en partie leur radiorésistance. Ce phénomène est lié à une augmentation de l'expression des protéines Chk1 et Chk2 à l'état basal dans les CSC. Ces protéines sont impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire pour permettre de réparer les dommages infligés à l'ADN par l'irradiation. De plus, la protéine ATM qui est suractivée est également impliquée dans la forte activité de réparation des lésions à l'ADN des CSC (Yin & Glass, 2011). Enfin, la protéine Bmi-1 semble également jouer un rôle dans l'efficacité de la réparation des CDB et ainsi dans la radiorésistance des CSC (Facchino *et al.*, 2010).

3.3. La résistance à l'apoptose

La résistance à l'apoptose est un des mécanismes les plus étudié au sein des cellules tumorales. Cependant, ce mécanisme est très complexe du fait du grand nombre de protéines susceptibles d'être impliquées dans cette déficience. Ainsi, les CSC résistantes à l'apoptose surexpriment des protéines anti-apoptotiques, telles que les isoformes anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Tagscherer *et al.*, 2008 ; Yajima *et al.*, 2009), sous contrôle de certains facteurs spécifiques comme Bmi-1. A l'inverse, les CSC répriment également l'expression des protéines pro-apoptotiques telles que les protéines BH3-only de la famille Bcl-2, ceci également sous contrôle de certains facteurs spécifiques (Twist, Bmi-1...) (Valsesia-Wittmann *et al.*, 2004 ; Jagani *et al.*, 2010).

3.4. La résistance aux espèces réactives de l'oxygène

Les CS normales et les CSC sur-expriment des antioxydants non enzymatiques ou enzymatiques permettant de neutraliser les ERO, tels que le glutathion (Nagano *et al.*, 2013) ou bien la superoxyde dismutase (Liu *et al.*, 2015), ceux-ci étant régulés par certaines protéines spécifiques des CS. C'est le cas par exemple de Bmi-1 qui va diminuer la production d'ERO (Wang *et al.*, 2012d) en augmentant la disponibilité en glutathion réduit (Nagano *et al.*, 2013). Ceci permet, entre autres, aux CSC de résister à l'effet des radiations ionisantes (Wang *et al.*, 2012d).

3.5. L'hypoxie

Les CSC étant localisées au sein de niches hypoxiques, elles sont moins sensibles aux différents traitements anti-cancéreux. En effet, les niches hypoxiques étant peu vascularisées, cela limite la quantité d'agents chimio-thérapeutiques délivrée au niveau des CSC (Sayed *et al.*, 2011). De plus, l'environnement hypoxique empêche également la formation des ERO et donc les effets indirects des radiations ionisantes sur les CSC (Höckel & Vaupel, 2001).

3.6. La quiescence

Les CS normales et les CSC sont généralement des cellules quiescentes (Wilson *et al.*, 2008). De nombreux agents chimiothérapeutiques ciblent préférentiellement les cellules proliférantes, rendant les traitements inefficaces contre ces CSC. Il en est de même pour les radiations ionisantes qui ciblent préférentiellement les cellules en phase mitotique.

3.7. L'auto-renouvellement

La radio- et chimio-résistance des CSC est également liée à leur capacité d'auto-renouvellement (Pajonk *et al.*, 2010). Cette capacité d'auto-renouvellement utilise les voies de signalisation Notch, Wnt ou Sonic Hedgehog décrites précédemment, ce qui permet de contrôler la division symétrique des CSC afin de maintenir le pool constant, puis de réaliser des divisions asymétriques pour reformer des cellules différenciées.

Objectifs

Comme nous l'avons rappelé dans le chapitre précédent, les carcinomes épidermoïdes des VADS sont le plus souvent diagnostiqués tardivement ce qui a pour conséquence des récidives loco-régionales fréquentes, une invasion métastatique et un taux de survie des patients qui n'excède pas 50%, 5 ans après traitement. Ce constat montre l'importance du développement de combinaisons thérapeutiques beaucoup plus efficaces et exemptes d'effets secondaires afin de préserver une qualité de vie acceptable pour les patients.

Différentes stratégies ont été précédemment élaborées dans notre laboratoire dans le but de réinitialiser la mort cellulaire dans une lignée tumorale, représentative de ces cancers des VADS résistants aux traitements conventionnels. Parmi ces stratégies, la réactivation de la voie de production du céramide, un second messenger lipidique pro-apoptotique, a été testée avec succès *in vitro* grâce à l'utilisation d'un cocktail pharmacologique agissant sur le métabolisme des sphingolipides (Alphonse *et al.*, 2002 ; Alphonse *et al.*, 2004). Dans une autre approche, ce sont les défenses anti-oxydantes de ces cellules qui ont été ciblées : en effet, l'utilisation de deux drogues, le diméthylfumarate et la L-buthionine sulfoximine ont permis de dépléter de façon transitoire (avant irradiation) la cellule de son contenu en glutathion (principal antioxydant intracellulaire) avec pour conséquence une induction de la mort cellulaire par apoptose dans la lignée SQ20B (Boivin *et al.*, 2011 ; Hanot *et al.*, 2012). Cependant, ces deux stratégies ont révélé leurs limites en termes de toxicité associée et n'ont donc pas été retenues pour des essais *in vivo*. Une troisième stratégie a fait l'objet d'études au laboratoire, à savoir l'utilisation d'un oligonucléotide anti-sens, l'OGX-427, dirigé contre la protéine de choc thermique HSP27, qui permet de radiosensibiliser la lignée SQ20B *in vitro* et *in vivo* (Aloy *et al.*, 2008 ; Hadchity *et al.*, 2009). Ce travail a permis le dépôt d'un brevet qui atteste du potentiel clinique de cette approche thérapeutique. Enfin, les cellules souches cancéreuses (CSC), suspectées d'être à l'origine de la récurrence de ce type de cancer, ont récemment été ciblées à l'aide de deux agents pharmacologiques, l'un (UCN-01) inhibant la protéine Chk1 et l'autre (ATRA, *all-trans retinoic acid*) inhibant l'ALDH (Bertrand *et al.*, 2014). Malheureusement, cette dernière combinaison thérapeutique ne semble pas être potentiellement applicable en clinique du fait des effets secondaires liés à l'utilisation de l'UCN-01. Hormis l'OGX-427, on constate donc qu'il est particulièrement difficile d'élaborer des stratégies thérapeutiques efficaces qui soient dénuées d'effets toxiques associés. Ces stratégies permettent toutefois de parfaire nos connaissances concernant les mécanismes qui conduisent à la radiorésistance tumorale par exemple.

L'objectif principal du travail présenté dans ce mémoire a donc été de tester une nouvelle stratégie thérapeutique ciblant une autre voie dérégulée dans les cancers des VADS résistants, celle impliquant les protéines de la famille Bcl-2. Pour cela, nous avons choisi un inhibiteur des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, l'ABT-737, associé à la radiothérapie. Nous avons choisi cet inhibiteur d'une part en raison de la forte spécificité de la molécule pour les protéines Bcl-2 et Bcl-X_L qui sont surexprimées dans les cancers des VADS et d'autre part en raison de résultats prometteurs obtenus sur d'autres types de cancers, solides ou non.

Le potentiel radiosensibilisant de l'ABT-737 a donc été testé sur quatre lignées cellulaires issues de cancers des VADS et de radiosensibilité graduelle. Les conséquences de cette association à l'échelle subcellulaire ont été étudiées sur la lignée la plus radio-résistante de notre panel et la plus connue au laboratoire, la lignée SQ20B. Ce travail a été complété par une approche *in vivo* **sur des souris xénogreffées avec la même lignée.**

Enfin, les CSC étant connues pour être fortement impliquées dans la radiorésistance tumorale et la récurrence des cancers des VADS de haut grade, nous avons également étudié l'effet de l'ABT-737 sur une sous-population de la lignée SQ20B, sous-population ayant des caractéristiques de CSC. Cette sous population étant à l'origine des récurrences locorégionales mais également de l'apparition de métastases, **nous avons étudié l'effet de cette combinaison thérapeutique sur la mort cellulaire, mais également sur la migration et l'invasion des cellules.**

L'ABT-737 ayant été décrite comme une molécule pouvant agir en synergie avec de nombreuses molécules chimio-thérapeutiques et ceci dans de nombreux cancers, **nous avons associé, dans une étude préliminaire, ABT-737, cisplatine et irradiation** afin de voir si cette combinaison pouvait permettre de diminuer les quantités de cisplatine dont les effets secondaires sont bien connus.

Matériels et Méthodes

1. Lignées cellulaires et traitements

1.1. Lignées cellulaires et conditions de culture

Les lignées cellulaires utilisées sont issues de carcinomes épidermoïdes des VADS. Elles sont cultivées en flasques de culture stériles à 37°C en atmosphère saturée en humidité et en présence de 5% de CO₂.

La lignée SQ20B a été établie à partir d'un carcinome épidermoïde du larynx et les lignées Cal27, Cal33 et SCC61 à partir de carcinomes épidermoïdes de la langue. Le milieu de culture utilisé pour les lignées SQ20B et SCC61 est composé de milieu Eagle modifié par Dulbecco (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium, PAA) à 4,5 g/L de glucose supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF, PAA), 0,1 g/L de streptomycine (PAA), 100 U/mL de pénicilline et 0,4 mg/L d'hydrocortisone (Sigma). Les lignées Cal27 et Cal33 sont cultivées dans un milieu composé de DMEM à 4,5 g/L de glucose supplémenté par 15% de SVF (PAA), 0,1 g/L de streptomycine (PAA) et 100 U/mL de pénicilline (PAA).

1.2. Tri des cellules souches cancéreuses et mise en culture

Une sous-population cellulaire ayant des caractéristiques de cellules souches (Bertrand *et al.*, 2013) est triée à partir de la lignée parentale SQ20B. Cette sélection est réalisée à l'aide de deux tris cellulaires consécutifs en cytométrie de flux (Gilormini *et al.*, in press).

1.2.1. Exclusion du Hoechst

Le premier critère utilisé pour trier les cellules souches cancéreuses (CSC) est fondé sur la surexpression des pompes transmembranaires (Hirschmann-Jax *et al.*, 2004) dans cette sous-population. La méthode consiste à marquer les cellules par un colorant vital, le Hoechst 33342, qui est exclu par les transporteurs de la famille ABC par une sous-population cellulaire enrichie en CSC appelée *Side population* (SP).

Les cellules SQ20B sont trypsinées et reprises dans du milieu de culture à une densité de 1x10⁶ cellules/mL. Elles sont incubées avec du Hoechst 33342 à 25 µg/L pendant 90 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite centrifugées à 300 x g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot cellulaire est lavé dans du tampon phosphate salin (PBS, *Phosphate Buffered Saline*) et une deuxième centrifugation est réalisée dans les mêmes conditions. Enfin, le culot cellulaire est repris à une densité de 10x10⁶ cellules/mL dans du PBS contenant de l'iodure de propidium

(IP) à 5 mg/L, qui permet d'exclure les cellules mortes (Figure 32.A.). Les cellules sont triées par cytométrie en flux en utilisant les propriétés spectrales du Hoechst 33342 qui est excité à une longueur d'onde de 355 nm et qui émet à deux longueurs d'ondes : 450 nm (Hoechst bleu) et 675 nm (Hoechst rouge). La Figure 32.A. montre un graphique typique obtenu, avec une SP présente dans la population P2 (vert) et des cellules mortes présentes tout à droite du graphique.

Parallèlement, un témoin négatif est réalisé dans les mêmes conditions d'incubation en ajoutant 50 mM de Vérapamil, un inhibiteur des pompes à efflux. Ce témoin doit être caractérisé par une absence de SP (Figure 32.B.).

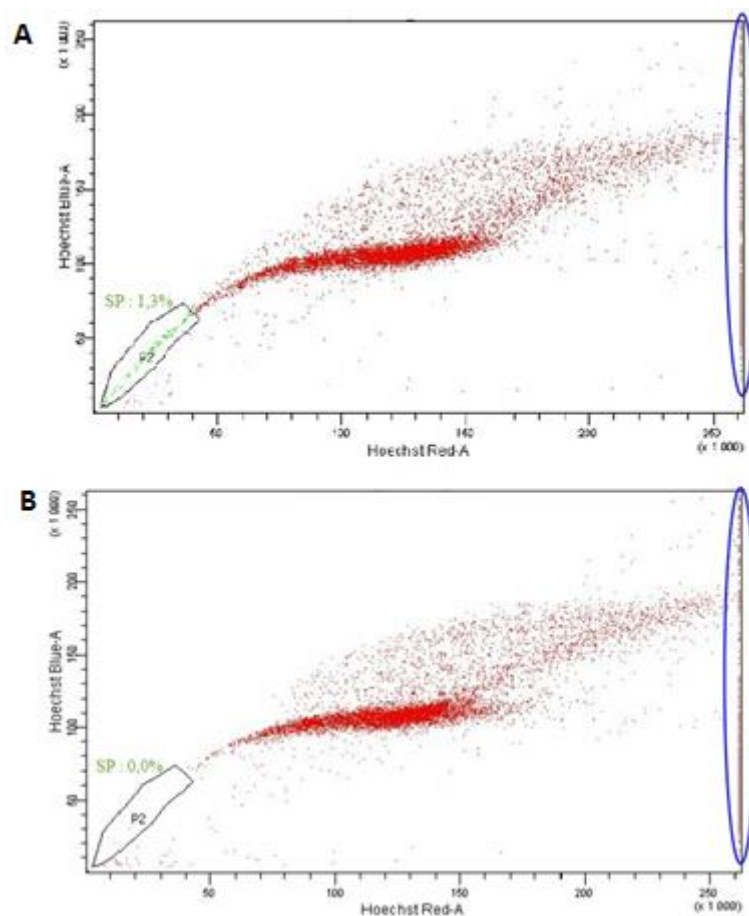


Figure 32 : Tri de la SP après marquage au Hoechst 33342.

A. La SP est localisée au niveau de la population appelée P2 en vert ; les cellules mortes sont marquées à l'IP et sont localisées à droite du graphique (entouré en bleu). **B.** En présence de Vérapamil, les pompes à efflux sont bloquées, le Hoechst ne peut plus sortir des cellules de la SP et cette population P2 ne compte plus d'évènements.

1.2.2. Marquage du récepteur CD44

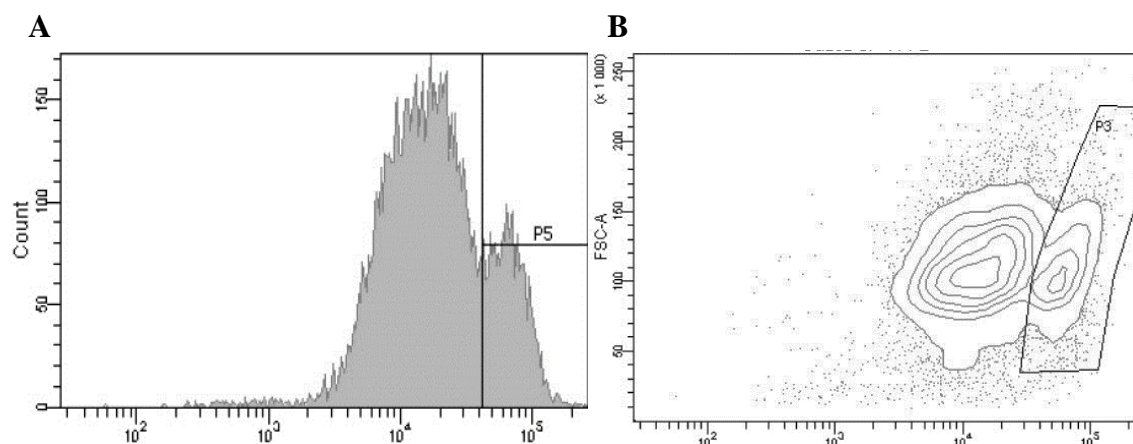


Figure 33 : Marquage du CD44 à partir de cellules SP.

A. Graphique montrant le nombre de cellules en fonction de l'intensité de marquage FITC ; la population appelée P5 est la population CD44^{high}. **B.** Une autre méthode de représentation graphique est la taille (*Forward Scatter*, FSC) des cellules en fonction de l'intensité de marquage FITC ; la population P3 représente également la population CD44^{high}.

Afin d'améliorer la pureté des CSC, un second tri est ensuite réalisé à partir de cette population SP en réalisant un marquage spécifique du récepteur à l'acide hyaluronique CD44. Dans les cancers des VADS, il a été montré que ce marqueur de surface est surexprimé dans les cellules ayant des propriétés de CSC (Prince *et al.*, 2007).

Les cellules issues du premier tri donnant la SP et remises en culture sont trypsinées et centrifugées à 300 x g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot est rincé au PBS et après une deuxième centrifugation réalisée dans les mêmes conditions, les cellules sont reprises dans un tampon PBS, 0,5% de BSA (*Bovine Serum Albumin*) et 2mM d'EDTA à une densité de 10×10^6 cellules/mL. Le marquage est réalisé avec un anticorps anti-CD44 couplé au fluochrome FITC (*Fluorescein Isothiocyanate*) (BD Biosciences) dilué au 1/100^{ème} dans la suspension cellulaire, ceci pendant 10 minutes à 4°C et à l'obscurité. Les cellules sont ensuite diluées avec 1 mL de tampon PBS, 0,5% de BSA et 2mM d'EDTA puis centrifugées à 300 x g à 4°C pendant 5 minutes. Le culot est rincé avec du PBS et après une deuxième centrifugation, les cellules sont re-suspendues dans du PBS à une densité de 10×10^6 cellules/mL afin d'être triées par cytométrie en flux. A l'issue de ce tri, on distingue deux populations différentes, la population CD44^{low} et la population CD44^{high} (Figure 33). Cette dernière est récupérée et remise en culture.

Cependant, à chaque passage, une partie des cellules se différencie et perd la caractéristique CD44^{high}, c'est pourquoi pour chaque expérience présentée, un contrôle du marquage CD44 est réalisé à chaque passage afin d'évaluer la pureté des CSC. Toutes les expériences ont été réalisées avec des cellules CD44^{high} présentant une pureté supérieure ou égale à 80%.

1.2.3. Double marquage des cellules : ALDH et CD44

Les CSC issues des VADS peuvent également être caractérisées par une forte expression de l'enzyme ALDH (Aldéhyde Déshydrogénase) (Chen *et al.*, 2009). Un autre tri peut être réalisé à partir de la population SP, en utilisant simultanément un double marquage CD44 et ALDH. La détection de l'activité ALDH (Aldefluor® ; StemCell) est basée sur une réaction enzymatique utilisant un substrat non fluorescent, le BODIPY-aminoacétaldéhyde, qui est transformé en BODIPY-aminoacétate fluorescent. Les CSC ayant un taux en ALDH supérieur accumulent le composé fluorescent en quantité plus importante par rapport aux cellules non souches.

Les cellules SP en culture sont trypsinées, centrifugées à 300 x g pendant 5 minutes à 4°C et le culot est repris à une densité cellulaire de 1x10⁶ cellules/mL par un tampon fourni dans le kit Aldefluor. Il est important d'utiliser ce tampon car il permet de maintenir le produit de réaction de l'ALDH à l'intérieur des cellules. La réaction enzymatique débute par l'addition d'Aldefluor® à une concentration de 1,2 µM pendant 40 minutes à 37°C. Parallèlement, un témoin négatif est réalisé en présence de 15 µM de diéthylaminobenzaldéhyde (DEAB), un inhibiteur de l'ALDH. A la fin de l'incubation, les cellules sont centrifugées à 300 x g pendant 5 minutes à 4°C et le culot est repris par du tampon contenu dans le kit Aldefluor® afin d'obtenir une densité de 10x10⁶ cellules/mL. Le marquage CD44 est réalisé avec un anticorps anti-CD44 couplé au fluochrome APC (Allophycocyanine) (BD Biosciences) dilué au 1/100^{ème} dans la suspension cellulaire, ceci pendant 10 minutes à 4°C et à l'obscurité. Les cellules sont ensuite diluées avec 1 mL de tampon Aldefluor® et centrifugées à 300 x g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot est rincé à l'aide du tampon Aldefluor® et après une deuxième centrifugation, les cellules sont re-suspendues dans ce tampon à une densité de 10x10⁶ cellules/mL afin d'être triées par cytométrie en flux. On observe alors la présence de quatre populations différentes (Figure 34) : une population CD44^{high}/ALDH^{high} et une population CD44^{low}/ALDH^{high} qui disparaissent en présence de DEAB, et des populations CD44^{high}/ALDH^{low} et CD44^{low}/ALDH^{low}.

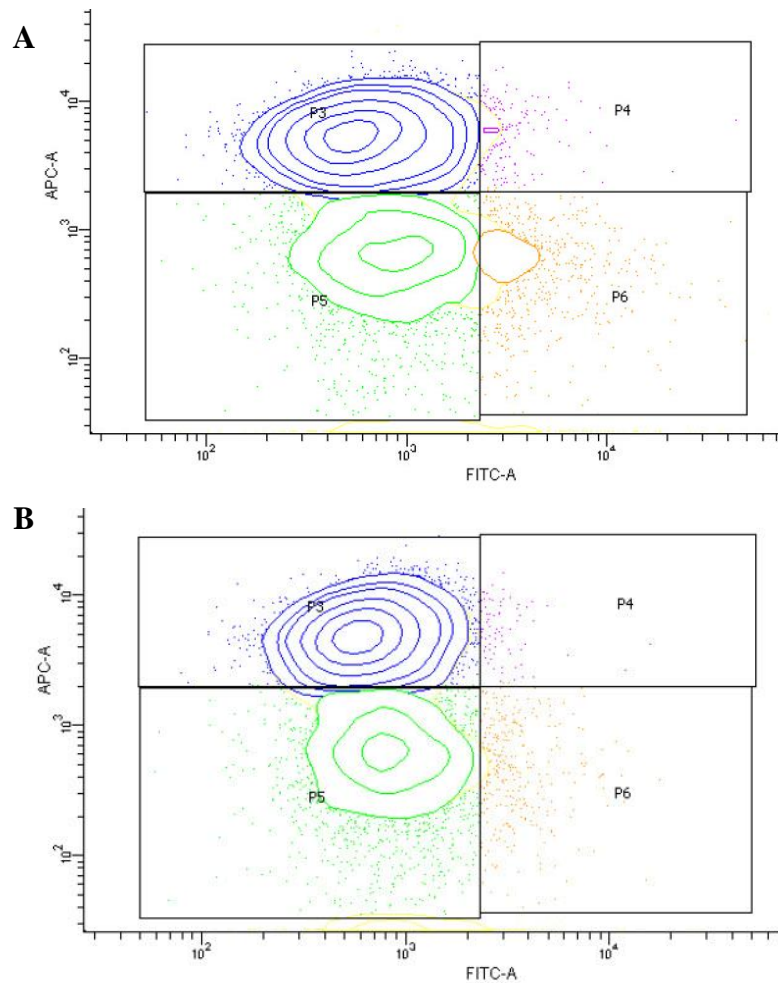


Figure 34 : Double marquage CD44 et ALDH.

A. Représentation graphique du marquage CD44-APC en fonction du marquage ALDH (FITC). La population P3 (bleu) correspond aux cellules $CD44^{high} / ALDH^{low}$, la population P4 (violet) représente les cellules $CD44^{high} / ALDH^{high}$, la population P5 (vert) contient les cellules $CD44^{low} / ALDH^{low}$ et la population P6 (jaune) visualise les cellules $CD44^{low} / ALDH^{high}$. **B.** Représentation graphique du témoin négatif lorsque les cellules sont incubées avec le DEAB, provoquant l'inhibition de l'ALDH et ainsi une diminution du nombre de cellules dans les P4 et P6.

Les cellules récupérées sont les cellules $CD44^{high}/ALDH^{high}$ et les cellules $CD44^{high}/ALDH^{low}$. Ces cellules sont remises en culture et, comme pour les cellules $CD44^{high}$, une vérification des caractéristiques ALDH et CD44 est réalisée automatiquement à chaque passage afin de vérifier le pourcentage des cellules doublement marquées.

1.2.4. Culture des CSC

Les cellules triées, que ce soit la SP, les cellules CD44^{high}, les CD44^{high}/ALDH^{low} ou les CD44^{high}/ALDH^{high}, sont cultivées en milieu DMEM 4,5 g/L de glucose (PAA):F12 (PAA) (3:1, v:v), 5% de SVF, 0.04 mg/L d'hydrocortisone (Sigma), 0,1 g/L de streptomycine (PAA), 100 U/mL de pénicilline (PAA) et 20 µg/L d'EGF.

Le deuxième milieu testé lors de la mise au point du tri est composé de milieu DMEM:F12 (PAA) (1:1, v:v), 1% de SVF, 0,1 g/L de streptomycine (PAA), 100 U/mL de pénicilline (PAA), 20 µg/L d'EGF (Eurobio) et 20 µg/L de β-FGF (*Fibroblast Growth Factor* ; Eurobio).

1.2.5. Culture en tumorisphères

La culture en tumorisphères est réalisée en boîtes de Pétri « low binding » dans un milieu composé de milieu DMEM 4,5 g/L de glucose (PAA):F12 (PAA) (3:1, v:v), 1% de SVF, 0,1 g/L de streptomycine (PAA), 100 U/mL de pénicilline (PAA), 20 µg/L d'EGF (Eurobio), 20 µg/L de β-FGF (Eurobio), 4 mg/L d'héparine (StemcellTM Technologies) et du B27 (B-27® Supplement (50X), minus vitamin A, Gibco) au 1X.

Pour marquer les cellules cultivées dans ces conditions, les tumorisphères sont récupérés en collectant le milieu de culture. La boîte est rincée deux fois par du PBS qui est poolé avec le milieu contenant les tumorisphères. Ce tube est ensuite centrifugé à 300 x g pendant 5 minutes à température ambiante et le culot est rincé par du PBS. Une deuxième centrifugation permet de récupérer un culot de tumorisphères pouvant être incubé avec de la trypsine pendant 5 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite dissociées par aspiration-refoulement à la pipette et la trypsine est arrêtée par du milieu de culture.

1.3. Traitements pharmacologiques

L'ABT-737 (Selleck Chemicals) est un inhibiteur des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. L'ABT-737 sous forme solide est dissout dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma) à une concentration de 10 mM (solution stock conservée à -80°C). Une solution mère de Cisplatine à 1 g/L est diluée extemporanément directement dans le milieu de culture à la concentration souhaitée.

Les cellules sont traitées 7 heures après leur ensemencement en remplaçant le milieu de culture par le même milieu contenant des concentrations croissantes en ABT-737, Cisplatine ou ABT-737 + Cisplatine.

Afin d'évaluer l'effet du DMSO, des cellules contrôles sont traitées par du milieu de culture cellulaire contenant 0,1 % de DMSO.

Comme témoin positif de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par la mitochondrie, nous avons utilisé l'Antimycine A (Sigma-Aldrich, A8674-25MG). Cette molécule est un inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire induisant l'arrêt de la consommation d'oxygène par la mitochondrie et la production d'ERO. 25 mg d'Antimycine A est solubilisé dans 4,55 mL d'éthanol absolu afin d'obtenir une solution à 10 mM. Cette solution stock est aliquotée et conservée à -20°C. Afin de traiter les cellules, la solution stock d'Antimycine A est diluée à 10 µM dans du milieu complet.

1.4. Etude de la combinaison du Cisplatine et de l'ABT-737

L'effet de la combinaison entre le Cisplatine et l'ABT-737 peut être déterminé par deux méthodes, l'une utilisant un graphique (Berenbaum, 1985) et l'autre par le calcul d'un paramètre appelé « Combination Index » (Chou & Talalay, 1983).

1.4.1. Méthode isobolographique

Cette méthode consiste à calculer la concentration de chaque drogue utilisée seule permettant d'inhiber la prolifération d'une lignée cellulaire donnée de 50% (aussi appelé IC50) par la formule ci-dessous :

$$IC_{50} = e^{\frac{\ln C_{>50\%} - [(P_{>50\%} - 50) / (P_{>50\%} - P_{<50\%}) * \ln (C_{>50\%} / C_{<50\%})]}{1}}$$

avec :

- C>50% : concentration induisant une diminution de prolifération supérieure à 50 % ;
- P>50% : la prolifération associée à cette concentration ;
- C<50% : concentration induisant une diminution de prolifération inférieure à 50 % ;
- P<50% : la prolifération associée à cette concentration.

Ces deux IC₅₀ sont alors reportées sur un graphique dont chaque axe correspond à une concentration de l'une des deux molécules. Ces 2 points de coordonnées (0 ; IC_{50A}) et (IC_{50B} ; 0) permettent de tracer la droite d'additivité des composés A et B (Figure 35).

Ensuite, il est nécessaire de calculer les IC₅₀ pour chaque drogue lorsqu'elles sont utilisées en association. Ces IC₅₀ sont ensuite reportées sur le graphique, permettant de déterminer l'effet de la combinaison des drogues à ces concentrations : antagoniste (point de la combinaison des deux molécules au-dessus de la courbe d'additivité), additive (point de la combinaison des deux molécules proche de la courbe d'additivité) ou synergique (point de la combinaison des deux molécules en dessous de la courbe d'additivité).

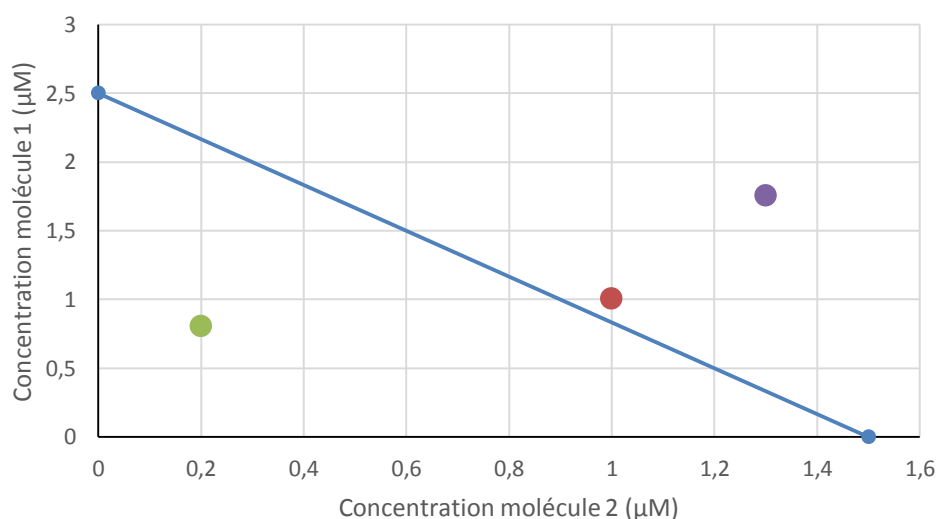


Figure 35 : Graphique permettant de déterminer l'effet de la combinaison de deux molécules.

Dans cet exemple, sur une lignée cellulaire X, la molécule 1 utilisée seule a une IC₅₀ de 2,5 µM et la molécule 2 de 1,5 µM (points bleus). La droite d'additivité est la droite bleue passant par ces deux points. Lors de la combinaison des deux molécules, à de faibles concentrations, les molécules sont synergiques (point vert ; IC₅₀ molécule 1 = 0,8 µM, molécule 2 = 0,2 µM) ; à des concentrations intermédiaires, les molécules sont additives (point rouge ; IC₅₀ molécule 1 = 1 µM, molécule 2 = 1 µM) ; à de fortes concentrations les molécules sont antagonistes (point violet ; IC₅₀ molécule 1 = 1,75 µM, molécule 2 = 1,3 µM).

1.4.2. Méthode du calcul du « Combination Index »

Dans cette deuxième méthode, les IC50 de chacune des molécules sont également calculées, ainsi que les différentes IC50 lors des combinaisons à différentes concentrations. Le paramètre « Combination Index » (CI) est calculé par la formule ci-dessous :

$$CI = (C_A / IC50_A) + (C_B / IC50_B)$$

avec :

- C_A : IC50 de la première molécule lors de la combinaison des deux molécules ;
- $IC50_A$: IC50 de la première molécule lorsqu'elle est utilisée seule ;
- C_B : IC50 de la deuxième molécule lors de la combinaison des deux molécules ;
- $IC50_B$: IC50 de la deuxième molécule lorsqu'elle est utilisée seule.

La valeur de CI obtenue indique l'effet des deux drogues dans les conditions testées :

- $CI > 1$: les drogues sont antagonistes ;
- $CI = 1$: les drogues sont additives ;
- $CI < 1$: les drogues sont synergiques.

1.5. Irradiation photonique

Les cellules sont irradiées entre 20 heures et 21 heures après ensemencement. Les irradiations en photons ont été réalisées à l'aide d'un irradiateur X-Rad 320 (PXi, USA) à un débit de dose de 2 Gy/minute, à une énergie de 250 kV et une intensité de 15 mA. Les doses déposées vont de 1 à 10 Gy.

1.6. Etude de la combinaison de l'ABT-737 et de l'irradiation

L'effet du traitement par l'ABT-737 combiné à l'irradiation est évalué par la méthode isobologique décrite par Steel et Peckham (1979), ce qui permet d'apprécier le niveau d'efficacité de la combinaison des deux traitements. Concrètement, une première courbe de l'effet des radiations seules (survie en fonction de la dose appliquée) est tracée, ainsi qu'une deuxième correspondant à l'association ABT-737/irradiation. Selon le placement des points à chaque dose, la combinaison des drogues est : antagoniste (point de la condition ABT-737/irradiation au-dessus du point de la condition irradiation), additive (les deux point sont

proches) ou synergique (point de la condition ABT-737/irradiation en-dessous du point de la condition irradiation).

2. Transfection par un siRNA dirigé contre Noxa

Afin de déterminer l'implication de la protéine Noxa dans la sensibilité des cellules SQ20B et CD44^{high} à l'ABT-737, nous avons réalisé une transfection de ces cellules avec un siRNA dirigé contre Noxa. Deux siRNA différents ont été testés : le Hs_PMAIPI_1 (Qiagen) et le Hs_PMAIPI_4 (Qiagen). Un siRNA contrôle a été utilisé comme témoin négatif.

Les cellules sont trypsinées etensemencées en boîtes de culture stériles à une densité de 400 000 cellules par boîte. Parallèlement, le mélange contenant le siRNA et le réactif de transfection HiPerFect (Qiagen ; 301707) est préparé :

- Le siRNA est dilué au 1/10ème à partir de la solution mère à 50 μ M dans de l'eau RNase-free afin d'obtenir une solution fille à 5 μ M ;
- 40 μ L de cette solution fille est incubée en présence de 50 μ L d'HiPerFect et de 4,91 mL de milieu DMEM ;
- Le mélange final est incubé pendant 5 minutes à température ambiante.

Dans chaque boîte de culture contenant les cellules à transfecter, on ajoute 1 mL du mélange préparé ci-dessus, le tout étant incubé pendant 24 heures à 37°C.

Le lendemain, les cellules sont traitées et/ou irradiées comme décrit précédemment. Dans le même temps, une boîte correspondant à chaque condition expérimentale (contrôle, siRNA-1 et siRNA-4) est récupérée afin de vérifier l'expression de la protéine Noxa (voir protocole Western blots).

3. Etude de la mort cellulaire

3.1. Test de toxicité au cristal violet

Les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits, à une même densité par puits, traitées et irradiées comme décrit précédemment. 72 heures après irradiation, les cellules sont fixées dans les puits par de l'éthanol à 96% pendant 30 minutes puis colorées par une solution d'HEPES 20 mM cristal violet 0,1% à pH 6 pendant 20 minutes. Après rinçage et séchage des

puits, les cellules colorées sont lysées par une solution de SDS 10% pendant 15 minutes et sous agitation. L'absorbance de chaque puits est lue par spectrophotométrie à 560 nm.

3.2. Survies clonogéniques

Les cellules sontensemencées dans des boîtes T-25 à différentes densités cellulaires selon la dose d'irradiation appliquée. Ces cellules sont traitées avec 10 μ M d'ABT-737, 7 heures après l'ensemencement, puis irradiées entre 13 et 14 heures après leur traitement (soit entre 20 et 21 heures après ensemencement). Les doses d'irradiation varient entre 0 et 5 Gy. La survie cellulaire est estimée par la technique standard de formation de colonies (Beuve *et al.*, 2008). Après irradiation, les cellules sont incubées en conditions normales de culture, ceci pendant un temps correspondant à 6 divisions cellulaires. Les cellules sont ensuite fixées pendant 30 minutes par de l'éthanol 96% et colorées au Giemsa pendant 30 minutes également. Le nombre de colonies présentant plus de 64 cellules est compté pour chaque boîte et la survie est calculée selon la formule :

$$\text{Survie} = \text{nombre de colonies} / (\text{PE} \times \text{nombre de cellules ensemencées})$$

avec PE = *Plating Efficiency* = nombre de colonies comptées à 0 Gy/nombre de cellules ensemencées à 0 Gy.

La courbe de survie tracée est modélisée par l'équation quadratique linéaire suivante :

$$\ln \text{Survie} = -\alpha D - \beta D^2$$

avec :

- D : dose de rayonnement déposé (Gy) ;
- α : tangente à l'origine de la courbe décrivant les lésions létales d'emblée ;
- β : tangente de la courbe après l'épaulement décrivant les lésions sublétales.

3.3. Analyse du cycle cellulaire

Les cellules sontensemencées en boîtes T-25, traitées comme décrit précédemment et irradiées ou non à 10 Gy. A chaque temps de récupération (24h, 48h, 72h, 120h), les cellules sont trypsinées et centrifugées à 300 x g pendant 5 minutes à 4°C. Après un rinçage du culot au PBS et une deuxième centrifugation, les cellules sont fixées par de l'éthanol à 70% à -20°C pendant 24 heures minimum. Les cellules sont de nouveau centrifugées et le culot lavé au PBS.

Enfin, les cellules sont reprises dans 500 μ L de PBS contenant 1 mg/l de 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) afin d'analyser la distribution des cellules dans le cycle cellulaire. L'analyse est réalisée par cytométrie en flux (FACScan, BD LSRII flow cytometer, BD Biosciences) à une longueur d'onde d'excitation de 355 nm. La longueur d'onde d'analyse utilisée est de 450 nm et le pourcentage de cellules présentes dans chaque phase (sub-G1, G0/G1, S, G2/M et 4n) est quantifié (BD FACSDIVA Software, BD Biosciences) (Figure 36).

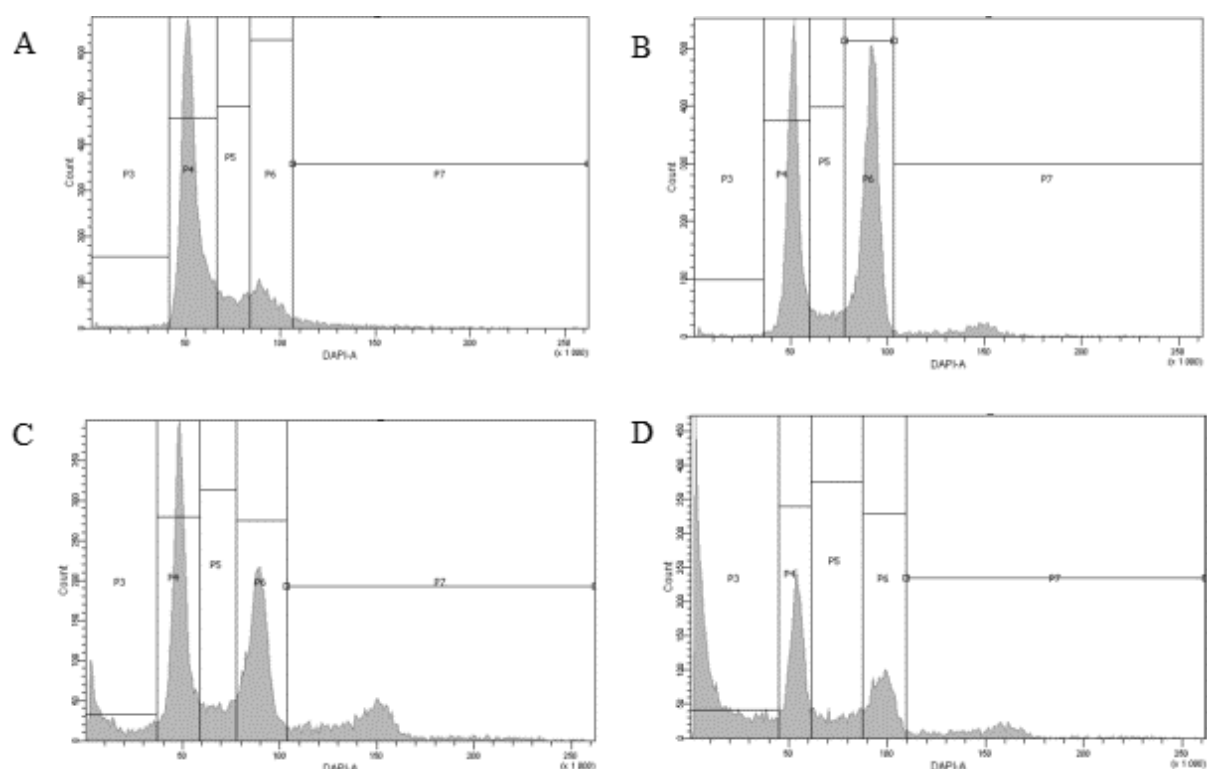


Figure 36 : Distribution de cellules dans le cycle cellulaire par coloration au DAPI et analyse par cytométrie en flux.

A. Cellules non irradiées, majoritairement en phase G0/G1 (P4). **B.** Cellules SQ20B 24h après irradiation montrant un arrêt en phase G2/M (P6). **C.** Cellules SQ20B 72h après irradiation montrant une augmentation de la mort cellulaire (sub-G1, P3) et de la mort mitotique (4n, P7). **D.** Cellules SQ20B 72h après traitement par l'ABT-737 et irradiation montrant une augmentation encore plus importante de la mort cellulaire.

3.4. Méthode TUNEL

La méthode TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*) est réalisée à l'aide du kit « the DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System » (Promega) suivant

les instructions du fabricant. Après le traitement et l'irradiation des cellules, celles-ci sont trypsinées à chaque temps de récupération (24h, 48h, 72h, 120h). Elles sont alors fixées avec une solution de paraformaldéhyde (PFA) dilué à 1% dans du PBS pendant 20 minutes à 4°C, puis centrifugées à 300 x g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot est rincé une fois par du PBS et les cellules sont perméabilisées dans de l'éthanol à 70% à -20°C pendant 4 heures minimum. Les cellules sont ensuite centrifugées à 300 x g pendant 5 minutes à 4°C et rincées par du PBS. Enfin, le marquage est réalisé par une incubation dans un mélange réactionnel contenant des nucléotides marqués à la fluorescéine et une Terminal Deoxynucleotidyl Transferase recombinante pendant 1 heure à 37°C. Ceci permet de marquer les extrémités de l'ADN avec la fluorescéine. Après un rinçage au PBS, les cellules sont également marquées avec de l'iodure de propidium (IP) à 5 mg/L contenant 0,5 g/L de RNase A pendant 30 minutes à température ambiante. Le marquage est analysé par cytométrie en flux (BD LSRII flow cytometer, BD Biosciences) avec une longueur d'onde d'excitation de 520 nm pour la fluorescéine et dont la longueur d'onde d'émission lue est à 600 nm. Le pourcentage de cellules fortement marquées est quantifié par le BD FACSDIVA Software (BD Biosciences).

3.5. Test des caspases activées

Le test d'activation des caspases totales est réalisé à l'aide du kit « CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker » (Promega) selon les recommandations du fabricant. Contrairement aux deux méthodes précédentes, le test des caspases se fait sur cellules vivantes à chaque temps de récupération, et non sur cellules fixées. Après leur trypsination, les cellules sont mises en présence de l'inhibiteur CaspACE™ FITC-VAD-FMK à 5 µM pendant 20 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite centrifugées à 300 x g pendant 5 minutes à 4°C et rincées une fois au PBS afin d'éliminer l'inhibiteur non fixé. Les cellules sont analysées par cytométrie en flux (BD LSRII flow cytometer, BD Biosciences) à une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et le marquage est lu à 530 nm. Le pourcentage de cellules positives au FITC, qui contiennent des caspases actives, est mesuré par le BD FACSDIVA Software (BD Biosciences).

4. Etude des cassures doubles brins de l'ADN

4.1. Visualisation des foci 53BP1

Les cellules sontensemencées en plaques 6 puits contenant des lamelles de microscopie (150 000 cellules par puits) puis traitées et irradiées à 2 Gy comme décrit précédemment. Aux différents points de cinétique (15 min, 30 min, 1h, 2h, 4h et 24h), les cellules sont rincées par du PBS froid et fixées par du PFA froid à 4% pendant 20 minutes. Après trois lavages au PBS froid, les lamelles sont incubées dans une solution de blocage (PBS, 2% de BSA et 2% de sérum de chèvre) pendant 1 heure à température ambiante. Une deuxième incubation avec la solution de blocage contenant des anticorps primaires anti-53BP1 (NB100-35 ; Novus Biological) dilués au 1/100^{ème} est réalisé pendant 1 heure à température ambiante. Les lamelles sont ensuite lavées 3 fois avec du PBS puis incubées avec l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à l'Alexa 488 (ab150073 ; Abcam) dilué au 1/500^{ème} dans la solution de blocage pendant 1 heure à température ambiante. Les lames sont lavées 3 fois avec du PBS et les noyaux sont colorés au DAPI par une solution à 5 mg/L pendant 10 minutes à température ambiante. Enfin, après 3 rinçages au PBS, les lamelles sont montées sur des lames à l'aide d'un milieu de montage (Glycergel® ; DAKO). Les lames sont observées par microscopie optique (Axio Imager Z2, Zeiss).

4.2. Test des comètes en conditions neutres

➤ Récupération des cellules

Le test des comètes est réalisé grâce au kit « CometAssay® » (Trevigen) selon les recommandations du fabricant. Les cellules sontensemencées à une densité de 150 000 cellules par puit de plaque 6 puits. Les cellules sont ensuite traitées et irradiées à 10 Gy. Après différents temps d'incubation (15 min, 30 min, 1h, 2h et 24h), les cellules sont trypsinées et centrifugées une première fois à 300 x g pendant 5 minutes à 4 °C. A partir de ce moment, les tubes contenant les cellules sont maintenus dans la glace. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est re-suspendu dans du milieu de congélation (10% DMSO ; 40% de milieu de culture adapté à la lignée cellulaire étudiée ; 50% SVF) à une concentration de 2x10⁶ cellules/mL. Les tubes sont introduits dans un récipient de congélation de cellules (CoolCell®, Biocizion) et placés à -80°C pendant une nuit.

➤ Dépôt des cellules sur les lames

Le lendemain les cellules sont décongelées et diluées avec 500 μL de tampon PBS 1X froid (4 °C). Une centrifugation à 300 x g pendant 5 minutes à 4 °C est réalisée et le surnageant est éliminé. Le culot cellulaire est repris dans du PBS 1X froid pour avoir une suspension de cellules à $1,5 \times 10^6$ cellules/mL. 50 μL de cette suspension sont transvasés dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. 450 μL de milieu LMPA (*Low Melting Point Agarose* ; Agarose 0,6% dissout dans du PBS) est ajouté et homogénéisé à l'aide de la micropipette. 40 μL de ce mélange est déposé sur une lame de microscope recouverte d'agarose (CometSlide™, Trevigen), puis cette lame est incubée 30 minutes à 4°C à l'abri de la lumière et en chambre humide. A ce stade, un contrôle positif est réalisé en ajoutant 50 μL de peroxyde d'hydrogène à 1 mM dans un tube contenant les cellules et l'agarose. Comme pour les autres tubes, 40 μL de cette suspension est déposé sur une lame et incubée à 4 °C.

➤ Lyse cellulaire

Après le séchage des lames, une étape de lyse cellulaire est réalisée. Les lames, sauf le contrôle positif, sont plongées horizontalement dans un tampon de lyse (NaCl 2,5 M, EDTA Na^+ 100 mM, Tris Base 10 mM, NaOH 0,2 M, Triton X-100 1%, DMSO 10%, pH 10,0) et sont incubées à 4°C pendant une nuit.

➤ Electrophorèse en milieu neutre

L'électrophorèse en milieu neutre est ensuite réalisée. Pour cela, les lames sont placées dans un système d'électrophorèse adapté (CometAssay® Electrophoresis System, Trevigen) et immergées dans le tampon d'électrophorèse neutre (Tris Base 100 mM, Acétate de sodium 300 mM, pH 9) pendant 30 minutes à 4°C. A la suite de cette étape d'équilibration, l'électrophorèse est lancée en appliquant un courant électrique de 21 volts pendant 45 minutes à 4°C.

➤ Précipitation de l'ADN et séchage des lames

A la fin de l'électrophorèse, les lames sont immergées dans un tampon de précipitation de l'ADN (Acétate d'ammonium 1 M, Ethanol 95%) pendant 30 minutes à température ambiante. Les lames sont ensuite immergées dans un bain d'éthanol à 70% pendant encore 30 minutes à température ambiante. Enfin, les lames sont séchées à 37°C pendant 15 minutes. Les lames peuvent alors être conservées à température ambiante.

➤ Marquage et analyse

Afin de marquer l'ADN, 100 µL de SYBR® Gold dilué au 1/30 000 dans du tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) est déposé sur chaque lame et incubé 30 minutes à température ambiante dans l'obscurité. Les lames sont ensuite rincées par de l'eau distillée et séchées à 37°C pendant 15 minutes. Les lames sont enfin observées en microscopie optique (Axio Imager Z2, Zeiss).

5. Etude des altérations mitochondriales

5.1. Mesure du potentiel de membrane mitochondrial

Le potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) est évalué grâce à la sonde JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide, Sigma-Aldrich, T4069-5MG) sur cellules vivantes. Les cellules sont ensemencées, traitées et irradiées dans les conditions décrites précédemment. Après différents temps d'incubation, les cellules sont trypsinées et incubées avec la sonde JC-1 à 5 mg/L pendant 20 minutes à 37°C. les cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux (BD LSRII flow cytometer, BD Biosciences) à une longueur d'onde d'excitation de 488 nm afin de visualiser la formation d'agrégats de JC-1 (vert), agrégats qui apparaissent lors de la chute du $\Delta\Psi_m$. La longueur d'onde d'émission est de 525 nm et le pourcentage de cellules présentant une coloration verte est quantifié par le BD FACSDIVA Software (BD Biosciences).

5.2. Délétion de l'ADN mitochondrial

5.2.1. Préparation du lysat cellulaire

Les cellules traitées et/ou irradiées à 10 Gy sont trypsinées et centrifugées à 300 x g pendant 5 minutes à 4°C. Les culots peuvent être stockés à -80°C. Ce culot est repris dans 1 mL de tampon de lyse 1X (Tween 20 0.005 v/v; NP40 0,05% v/v; Tris HCl 10 mM pH 8,3) puis les cellules sont broyées 2 minutes à 30 Hz par des billes de 2 mm de carbure de tungstène (Retsch MM 301 mixer). La protéinase K est ajoutée à une concentration finale de 0,1 g/L et les échantillons sont incubés à 56°C pendant 30 minutes. La protéinase K est inactivée par une incubation à 98°C pendant 15 minutes.

5.2.2. Amplification de l'ADN par PCRq

30 µL de lysat est dilué dans 100 µL de tampon de lyse 0,5X et soniqué pendant 10 minutes. 14 µL de ce nouveau lysat est dilué dans 8 µL de tampon de lyse 1X soniqué et de 48 µL d'eau (concentration finale du tampon de lyse 0,214X). Cette étape de dilution est réalisée dans le but d'homogénéiser le détergent présent dans le tampon de lyse afin d'obtenir des PCR quantitatives (PCRq, *Polymerase Chain Repeat*). L'analyse en PCRq est réalisée par le LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche). Chaque réaction de PCRq est réalisée avec 5 µL de lysat final, 7 mM de MgCl₂ et 0,4 µM de primers Forward et Reverse. Les séquences des primers sont données dans le Tableau 7.

	Forward	Reverse
<i>GAPD</i>	CCTGTTTCATCCCTCCACACATC	CCAGTGATTTTCCAGCCCTAATC
<i>H</i>		
<i>ADNmt</i>	GGGTTAAAAACCGACGCAATC	AATGGGTATGAAGCTGTGATTTG
<i>total</i>		AG
<i>ADNmt</i>	TCAGCAACCGACTACACTCATT	AGTTATGGATGTGGCGATTAAAG
<i>délété</i>	TC	TG

Tableau 7 : Séquence de primers pour la PCRq.

Le protocole de PCRq est composé d'un premier cycle de 600 secondes à 95°C pour activer la Taq polymérase, suivi d'un second segment de 45 cycles décomposés en trois étapes : une étape de 20 secondes à 95°C, une deuxième étape de 5 secondes à 54°C et une troisième étape de 8 secondes à 72°C ; enfin, un troisième et dernier segment de 1 cycle comprenant trois étapes de 20 secondes à 95°C, 30 seconde à 68°C et 30 secondes à 95°C. La quantité d'ADN mitochondrial (ADNmt) total et d'ADNmt délété sont normalisés par la GAPDH pour chaque échantillon par un ratio :

$$A1 = (E_{ADNm \text{ total}})^{ACt \text{ ADNmt total (calibrateur-échantillon)}} / (E_{GAPDH})^{ACt \text{ GAPDH (calibrateur-échantillon)}}$$

et le ratio :

$$A2 = (E_{ADNm \text{ délété}})^{ACt \text{ ADNmt délété (calibrateur-échantillon)}} / (E_{GAPDH})^{ACt \text{ GAPDH (calibrateur-échantillon)}}$$

avec E correspondant à l'efficacité de PCR corrigé par le logiciel LinRegPCR. Le ratio d'ADNmt délété par rapport à l'ADNmt total est obtenu par $A2/A1$.

6. Etude de l'équilibre redox

6.1. Mesure du glutathion intracellulaire par HPLC

Après récolte des cellules par trypsination, les cellules sont centrifugées à $300 \times g$ pendant 10 minutes. Le culot cellulaire est repris par 350 μL de tampon phosphate de sodium (25 mM Na_2HPO_4 , 25 mM NaH_2PO_4 , pH 6) et soumis aux ultrasons. L'homogénat obtenu est incubé 30 minutes à 4°C avec 100 μL de dithiothréitol à 25 mM et 50 μL de Tris 0,1 M pH 8,5, afin de permettre la réduction des molécules oxydées. La réaction est arrêtée par la précipitation des protéines lors de l'ajout de 750 μL d'acide sulfo-salicylique à 2,5%.

50 μL de ce mélange est incubé avec 50 μL d'ortho-phthalaldéhyde pendant 1 minute afin de faire une réaction de dérivation. La réaction est arrêtée par l'addition de 500 μL de phosphate de sodium à 100 mM à pH 7.

Enfin, l'échantillon est analysé par HPLC sur une colonne C18 (200 x 46 mm) entraîné par une phase mobile composée d'acétate de sodium à 0,15 M pH 6,5 et de 8% de méthanol. La détection fluorométrique est réalisée en sortie de colonne à une longueur d'onde d'excitation de 340 nm et une longueur d'onde d'émission de 420 nm.

Parallèlement, 50 μL de l'homogénat de départ est également utilisé pour doser les protéines selon la méthode de Lowry. L'homogénat est additionné de 2 mL de solution de 2% de carbonate de calcium, 0,1 M de NaOH et 0,02% de tartrate de sodium, ainsi que de 40 μL d'une solution de 0,5% de sulfate de cuivre. Le cuivre en milieu alcalin se complexe aux liaisons peptidiques. L'addition de 200 μL de réactif de Folin (réactif phosphomolybdique) permet l'interaction avec le cuivre complexé. La réaction se fait à température ambiante pendant 30 minutes et donne une coloration bleue proportionnelle à la quantité de protéines.

Pour chaque échantillon, les concentrations en glutathion total (GSH) et en glutathion oxydé (GSSG) sont mesurées et normalisées par la concentration en protéines, donnant un nombre de mole de glutathion/g de protéines. Les concentrations de GSSG sont ensuite normalisées par les concentrations en GSH pour chaque échantillon. Enfin, l'évolution de cette

concentration en présence d'ABT-737 est rapportée à celle mesurée dans les échantillons contrôles.

6.2. Mesure de la production d'espèces réactives de l'oxygène

La production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans la cellule est mesurée à l'aide du dihydroéthidium (DHE, Sigma-Aldrich, D7008-10MG). Cette sonde, une fois oxydée par les ERO émet une fluorescence bleue. Après trypsination des cellules, le DHE à une concentration de 4 μ M est incubé avec les cellules vivantes pendant 10 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux (BD LSRII flow cytometer, BD Biosciences) à une longueur d'onde d'excitation de 520 nm et une longueur d'onde d'émission lue à 600 nm. Le pourcentage de cellules présentant une fluorescence est quantifié par le BD FACSDIVA Software (BD Biosciences).

6.3. Mesure de la production des ERO intra-mitochondriaux

La production des ERO intra-mitochondriales est étudiée grâce à la sonde spécifique MitoSOX (MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator, Molecular Probes) selon les recommandations du fabricant. Cette sonde, qui s'accumule spécifiquement dans la mitochondrie, émet une fluorescence rouge lorsqu'elle est oxydée.

6.3.1. Mesure par microscopie

Afin de vérifier la spécificité de la sonde MitoSOX dans les conditions utilisées, nous avons réalisé une mesure par microscopie en présence d'Antimycine A.

Les cellules sontensemencées en plaques 6 puits contenant des lamelles de microscopie stériles. Après 24 heures, les cellules sont marquées par la sonde Mitotracker® Green FM (Invitrogen) afin de marquer les mitochondries. Pour cela, le tapis cellulaire est lavé par un tampon Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco) puis incubé pendant 30 minutes à 37°C avec 50 nM de MitoTracker® Green FM dilué dans du tampon HBSS. Les cellules sont ensuite remises en milieu de culture standard contenant l'Antimycine A à 10 μ M (voir partie 1.3. de Matériels et Méthodes). Les cellules sont ensuite incubées 30 minutes à 37°C. A la fin de l'incubation, un marquage par la sonde MitoSOX est réalisé : les cellules sont rincées par du tampon HBSS et incubées pendant 30 minutes à 37°C avec la sonde diluée à 5 μ M dans du tampon HBSS. Les cellules sont de nouveau rincées, puis fixées au paraformaldéhyde (PFA) à

4% pendant 20 minutes. Une contre-coloration au DAPI à 1 mg/L est réalisée avant le montage des lamelles sur des lames de microscopie. Les cellules sont ensuite observées par microscopie optique (Axio Imager Z2, Zeiss).

6.3.2. Mesure par cytométrie de flux

Les cellules sontensemencées, traitées (DMSO ou ABT-737) et irradiées comme décrit précédemment. 30 minutes avant chaque temps (4h, 8h, 16h et 24h), un marquage par la sonde MitoSOX est réalisé : les cellules sont rincées par du tampon HBSS et incubées 30 minutes à 37°C avec la sonde diluée à 5 µM dans du tampon HBSS. Les cellules sont de nouveau rincées, puis trypsinées et fixées au PFA à 4% pendant 20 minutes. Deux rinçages successifs sont réalisés et une contre coloration au DAPI à 1 mg/L est réalisée afin d'exclure les cellules déjà mortes. Le pourcentage de cellules présentant une coloration rouge est quantifié par le BD FACSDIVA Software (BD Biosciences) (λ excitation = 488 nm ; λ émission = 550 nm).

7. Analyse protéique par Western blot

7.1. Préparation et purification de mitochondries isolées

Les mitochondries sont extraites et purifiées grâce au kit FOCUS™ SubCell (G-Biosciences) selon les instructions du fabricant. Les cellules sont trypsinées, centrifugées à 300 x g pendant 5 minutes à 4°C et le culot est rincé une fois au PBS. Le culot cellulaire de 20×10^6 cellules est repris par 500 µL de tampon 1, présent dans le kit, et incubé pendant 10 minutes à 4°C. Les cellules sont alors passées 20 fois dans une aiguille 21G afin de lyser les cellules et on ajoute 250 µL de tampon 2. Une première centrifugation à 700 x g pendant 10 minutes permet de séparer les débris cellulaires et les noyaux présents dans le culot des fractions cytosolique et mitochondriale présentes dans le surnageant. Ce surnageant est soumis à une deuxième centrifugation à 12 000 x g pendant 15 minutes afin de séparer les mitochondries présentes dans le culot du cytoplasme et des membranes subcellulaires présentes dans le surnageant. Les mitochondries sont ensuite purifiées par un lavage dans 500 µL de tampon 2 contenu dans le kit et re-centrifugées à 12 000 x g pendant 15 minutes. Les culots secs de mitochondries et la fraction cytoplasmique peuvent être stockées à -80°C. La purification est vérifiée par Western blot en utilisant un anticorps anti-COX IV (Cell Signaling, 11967) spécifique des mitochondries et un anticorps anti- α -tubuline (Santa Cruz, sc-8035) spécifique du cytosol (Figure 37).

Pour le Western blot de la translocation de Bax à la mitochondrie, les mitochondries extraites sont traitées par une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 0,1 M à 4°C pendant 20 minutes. Les mitochondries sont alors centrifugées à 12 000 $\times g$ pendant 15 minutes. Le surnageant contient alors les protéines faiblement liées à la mitochondrie et est éliminé.

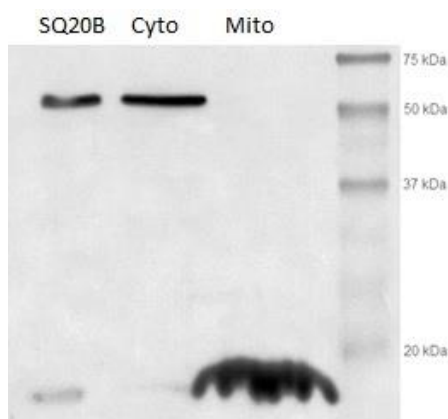


Figure 37 : Purification des mitochondries.

Western blot réalisé à la suite d'une purification de mitochondries avec un anticorps anti- α -tubuline (55 kDa) et un anticorps anti-COX IV (17 kDa). Ligne 1 : SQ20B totale ; ligne 2 : SQ20B Cytoplasme ; ligne 3 : SQ20B Mitochondries.

7.2. Préparation des échantillons pour les Western blots

Que ce soit pour les études d'expression au niveau basal ou bien pour les cinétiques après traitement et/ou irradiation (24h, 48h, 72h), les cellules sont trypsinées, centrifugées à 300 $\times g$ à 4°C pendant 5 minutes et le culot est rincé une fois au PBS. Afin d'extraire les protéines des cellules, celles-ci sont lysées par 250 μL de tampon de lyse (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1% Triton X-100) contenant des anti-protéases et des anti-phosphatases (Roche) pendant 30 minutes à 4°C et en les passant 10 fois à travers une aiguille 21G. Le lysat est ensuite centrifugé à 15 000 $\times g$ pendant 20 minutes à 4°C afin de récupérer le surnageant contenant les protéines.

Pour extraire les protéines des mitochondries, la même technique est appliquée, dans des volumes de tampon de lyse plus faibles (50 μL).

La concentration en protéines dans les lysats est dosée par la méthode à l'acide bicinchonique (BCA) à l'aide d'une gamme d'étalonnage réalisée avec de l'albumine sérique bovine allant de 0 à 80 mg/L. Un aliquot de 10 μL est prélevé pour le dosage. La gamme et les échantillons sont incubés en présence de SDS 0,05% et de BCA- CuSO_4 0,01% pendant 30 minutes à 37°C. Les ions cuivreux réagissent avec les protéines en milieu alcalin et donnent une coloration pourpre proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon. L'absorbance est mesurée à la longueur d'onde de 562 nm.

7.3. Electrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) et transfert sur membrane de nitrocellulose

Selon la protéine étudiée, 20 µg, 40 µg ou 60 µg de protéines (Tableau 8) sont dilués au demi dans un tampon dénaturant (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% glycérol, 2% SDS, 5% β-mercaptoéthanol, 0,05% bleu de bromophénol) puis dénaturés pendant 5 minutes à 100°C avant d'être déposé sur un gel de polyacrylamide.

Des gels de polyacrylamides à différents pourcentages ont été utilisés en fonction de la protéine étudiée (Tableau 8). Ces gels de séparation sont tous composés de 412,5 mM de Tris-HCl pH 8,8, 1% de SDS, 0,1% de TEMED et 1% de persulfate d'ammonium. Le seul facteur qui varie est le pourcentage en acrylamide/bisacrylamide qui va de 12% à 16%. Quel que soit le gel de séparation, un gel de concentration identique est coulé au-dessus, au niveau des puits de dépôt. Ce gel de concentration est composé de 4,3% d'acrylamide/bisacrylamide, 130 mM de Tris-HCl pH 6,8, 1% de SDS, 0,1% de TEMED et 1% de persulfate d'ammonium.

Les protéines dénaturées sont déposées sur le gel de polyacrylamide avec un marqueur de poids moléculaire adapté et la migration est réalisée à 130 V pendant 90 minutes dans une cuve Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad). Une fois cette migration terminée, un transfert semi-sec est réalisé à l'aide du Trans-Blot® Turbo™ Transfert System (Bio-Rad) et des consommables prêts à l'emploi associés, comprenant les papiers filtres et une membrane de nitrocellulose pré-incubée dans le tampon de transfert. Le programme de transfert utilisé est le programme MIXED MW. La membrane de nitrocellulose est ensuite incubée dans du tampon TBS (*Tris-buffered saline*) pendant 5 minutes.

Protéine d'intérêt	Fournisseur /Référence	Hôte de production	Quantité de protéines (µg)	Gel SDS-PAGE (%)	Solution de blocage	Dilution
Bcl-2 (26 kDa)	Santa Cruz / sc-509	Souris	20	12	0,05% Tween20 ; 5% lait	1/1 000
Bcl-X_L (26 kDa)	Cell Signaling / 2762	Lapin	40	12	0,1% Tween 20 ; 5% BSA	1/2 000
Mcl-1 (37 kDa)	Santa Cruz / sc-819	Lapin	20	12	0,1% Tween 20 ; 5% lait	1/1 000
Bax (20 kDa)	Santa Cruz/ sc-493	Lapin	20	12	0,1% Tween 20 ; 5% lait	1/1 000
Bak (25 kDa)	Cell Signaling / 3814	Lapin	20	12	0,1% Tween 20 ; 5% BSA	1/2 000
Bim (22, 16 et 12 kDa)	Cell Signaling / 2933	Lapin	20	14	0,1% Tween 20 ; 5% BSA	1/1 000
Puma (23 kDa)	Cell Signaling/ 4976	Lapin	20	12	0,1% Tween 20 ; 5% BSA	1/1 000
Noxa (11 kDa)	Enzo Life Sciences / ALX-804-408	Souris	60	14	0,1% Tween 20 ; 5% lait	1/250
Caspase-3 (32, 17 et 12 kDa)	Cell Signalling/ 9662	Lapin	20	12	0,05% Tween20 ; 5% lait	1/1 000
COX-IV (17 kDa)	Cell Signaling / 11967	Souris	20	14	0,1% Tween 20 ; 5% lait	1/2 000
GAPDH (37 kDa)	Biodesign / H-86-504M	Souris	20	12	0,1% Tween 20 ; 5% lait	1/60 000
α-tubuline (55 kDa)	Santa Cruz / sc-8035	Souris	20	12	0,1% Tween 20 ; 5% lait	1/1 000

Tableau 8 : Informations et paramètres d'utilisation des anticorps primaires lors des Western blots.

7.4. Marquage et révélation des protéines par chimiluminescence

La membrane de nitrocellulose est ensuite incubée pendant 1 heure à température ambiante dans une solution de blocage contenant du TBS, du Tween 20 dont le pourcentage dépend de l'anticorps (Tableau 8) et 5% de lait ou de BSA selon l'anticorps utilisé. La membrane est alors incubée avec l'anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt, dilué dans la même solution que la solution de blocage, pendant 1 heure à température ambiante. Les dilutions des anticorps utilisés sont précisées dans le Tableau 8. Afin d'éliminer les interactions non spécifiques de l'anticorps, la membrane est ensuite lavée trois fois pendant 5 minutes avec une solution TBS Tween 20 appropriée. L'anticorps secondaire [anti-souris ou anti-lapin couplé à la peroxydase de raifort (HRP)] est également incubé pendant 1 heure à température ambiante dans la solution de blocage (Tableau 9).

Enfin, les membranes sont révélées par une incubation avec un substrat de la HRP qui produit un substrat luminescent (Clarity™ Western ECL Substrate, Bio-Rad). La visualisation de la luminescence produite est réalisée par le « LAS-3000 Intelligent Dark Box » (Fujifilm) et les mesures sont réalisées à l'aide du logiciel Multi Gauge V3.0 (Fujifilm).

<i>Anticorps</i>	Fournisseur	Référence	Dilution
<i>Anti-souris-HRP</i>	Santa-Cruz	sc-2031	1/10 000
<i>Anti-lapin-HRP</i>	Cell Signaling	# 7074	1/2 000

Tableau 9 : Informations et paramètres d'utilisation des anticorps secondaires lors des Western blots.

8. Etude de la migration et de l'invasion cellulaire



Figure 38 : Principe de la mesure de la migration et de l'invasion grâce au xCELLigence.
(Source : <http://www.aceabio.com/>)

La migration et l'invasion cellulaire sont évaluées grâce à l'xCELLigence (RTCA DP, ACEA) sur le même principe que celui des chambres de Boyden (Boyden, 1962). Deux compartiments sont séparés par une membrane poreuse à travers laquelle les cellules peuvent migrer. Les cellules sontensemencées dans le compartiment du haut dans un milieu dépourvu de SVF alors que le compartiment du bas contient du milieu de culture contenant 10% de SVF. Des électrodes sont positionnées sur la membrane, du côté du puits inférieur (Figure 38). Lorsque les cellules migrent vers la chambre inférieure, elles adhèrent aux électrodes : l'environnement ionique est alors modifié, augmentant ainsi l'impédance qui est mesurée. Cette impédance va augmenter en fonction de différents facteurs : le nombre de cellules mais aussi leur forme et leur capacité d'adhésion.

Pour la migration, avant d'ensemencer les cellules dans les CIM-plates, ces dernières sont préparées en mettant 160 μ L de milieu contenant 10% de SVF dans la chambre inférieure. La chambre supérieure est alors « clipée » par-dessus et 50 μ L de milieu sans SVF est ajouté dans celle-ci. La plaque est alors incubée pendant 1 heure à 37°C pour être équilibrée.

Pour l'invasion, les membranes des chambres supérieures doivent être recouvertes de Matrigel (BD Matrigel™ Matrix, BD Biosciences) préalablement dilué au 1/25^{ème} dans du milieu sans SVF. 50 μ L de Matrigel sont déposés dans chaque puits et afin d'avoir une épaisseur fine et une répartition homogène du Matrigel ; 30 μ L est ensuite enlevé. Ces chambres supérieures sont alors incubées pendant 4 heures à 37°C. Les puits sont ensuite traités de la même façon que pour la migration.

Les cellules sontensemencées dans des flasques stériles afin d'être traitées et/ou irradiées comme décrit précédemment. Après irradiation, elles sont trypsinées, comptées et centrifugées. Le culot cellulaire est repris dans du milieu sans SVF pour être à une densité de 250 000 cellules/mL pour la migration et de 500 000 cellules/mL pour l'invasion. 100 μ L sont déposés dans les puits. Le programme est lancé 30 minutes après l'ensemencement et mesure l'impédance toutes les 15 minutes pendant 24 heures.

9. Exploration du métabolisme des céramides

9.1. Extraction des sphingolipides

L'extraction est réalisée à partir des cellules en culture selon une technique adaptée à partir de la méthode de Kirklund (1987). Chaque extraction est réalisée à partir d'environ $1,5 \times 10^6$ cellules.

9.1.1. Réactifs

➤ *Préparation du mélange d'étalons internes (EI)*

Ce mélange est réalisé extemporanément à partir des solutions mères reportées dans le Tableau 10 conservées en Chloroforme/Méthanol (1:2, v:v). On prélève 3 mL de chaque solution mère et on évapore l'ensemble sous azote. Le résidu sec (pool d'EI) est ensuite repris par 3 mL de Chloroforme/Méthanol (1:2, v:v) et conservé à -20°C avant utilisation.

<i>Espèce moléculaire</i>	<i>Concentration (g/L)</i>
<i>Sphingomyéline C16D31</i>	20
<i>Céramide C17</i>	50
<i>Glucosylcéramide C16D3</i>	10
<i>Galactosylcéramide C18D35</i>	50
<i>Lactosylcéramide C16D3</i>	10
<i>Sulfatides C18D3</i>	10
<i>GM1 C8D3</i>	10
<i>GM2 C8D3</i>	10
<i>GM3 C8D3</i>	10

Tableau 10 : Solutions mères d'étalons internes.

➤ *Préparation de la solution de saponification*

Cette solution (KOH 1M) est également préparée extemporanément. Pour cela, on pèse 0.56 g de KOH que l'on dissout dans 10 mL de méthanol, sous agitation. La solution est conservée à 4°C avant utilisation.

9.1.2. Traitement des échantillons

➤ *Dosage des protéines*

Les culots cellulaires sont repris par 500 μ L d'eau distillée et le mélange est soniqué à l'aide d'une sonotrode pendant 30 secondes dans la glace. On prélève un aliquot de 100 μ L auquel on ajoute 100 μ L d'eau. Le dosage est réalisé selon la méthode BCA sur un automate ABX Pentra.

➤ *Extraction des sphingolipides*

Dans un tube en verre de 10 mL, on ajoute 500 μ L de la solution protéique à laquelle on ajoute 50 μ L du pool d'EI et 2,5 mL de Chloroforme/Méthanol (1:2, v:v). Après avoir mélangé, les tubes sont bouchés et agités plusieurs fois sur une période de 10 minutes. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 3 000 rpm à 4°C et le surnageant transféré dans un autre tube avant évaporation sous azote.

➤ *Saponification*

Le résidu sec est repris par 1,5 mL de Chloroforme/Méthanol (1:2, v:v) puis placé pendant 30 secondes dans un bain marie à ultrasons puis agité vigoureusement. La saponification est réalisée par addition de 150 μ L de KOH 1 M en méthanol. Après agitation et passage dans le bain-marie à ultrasons pendant 30 secondes, le mélange est incubé pendant 2 heures à 37°C puis laissé refroidir à température ambiante. Le mélange est ensuite neutralisé par addition de 6 μ L d'acide acétique glacial (le pH est vérifié en fin de saponification).

➤ *Purification des extraits lipidiques par chromatographie sur colonne*

Les colonnes utilisées sont des C18 (Bond Elut, 100 mg, Varian) disposées sur un système Vac Elut (Varian). Les colonnes sont tout d'abord rincées par 2 mL de Chloroforme/Méthanol (1:2, v:v) puis 1 mL de méthanol. Les extraits lipidiques saponifiés sont repris par 2 mL de Méthanol/Eau (1:1, v:v) et le tout est remis en suspension à l'aide de pipettes Pasteur. Les échantillons sont déposés au sommet des colonnes et élués sous vide. On ajoute aux filtrats 2 mL de Méthanol/Eau (1:1, v:v) et après avoir mélangé, on redépose les mélanges sur les colonnes. Les colonnes sont ensuite dessalées par 700 μ L d'eau distillée. Les extraits lipidiques sont enfin élués des colonnes par deux éluations successives : une première élution est réalisée à l'aide de 3 fois 500 μ L de Méthanol/Eau (12:1, v:v) = **éluat 1**. La seconde est réalisée

à l'aide de 4 fois 500 µL de Chloroforme/Méthanol (1:2, v:v) = **éluat 2**. Ces éluats sont évaporés sous azote et conservés à -20°C avant analyse.

9.2. Analyse en HPLC- MS/MS

9.2.1. Mise en tube d'injection

Chaque éluat est repris par 2 mL de phase mobile (Chloroforme/Méthanol, 2:1, v:v). On transfère 1 mL de l'éluat 1 dans un tube d'injection. On poole 1 mL d'éluat 1 + 1 mL d'éluat 2 dans un 2^{ème} tube d'injection ; on récupère 2 tubes d'injection par échantillon à analyser. On prépare en plus un tube contenant le mélange d'EI utilisé au cours de la purification.

9.2.2. Analyse des échantillons

Les échantillons sont repris dans du Chloroforme/Méthanol (1:2, v:v) puis injecté directement dans le spectromètre de masse en tandem (API 4500QTRAP; Sciex Applied Biosystems, Toronto, Canada) en mode positif à une vitesse de 200 µL/min (temps d'analyse de 3 minutes). L'analyse est effectuée en mode MRM (multiple réaction monitoring).

La concentration de chacune des espèces de Céramides (Cer) est calculée en fonction du rapport du signal (aire du pic) au standard interne correspondant. La quantité totale de Cer représente la somme de la concentration de chacune des espèces.

10. Etude in vivo

Ces travaux ont été réalisés selon la directive européenne 2010/63/UE, après l'obtention en 2012 d'une autorisation à l'expérimentation animale de niveau I (FELASA C) par l'Université Claude Bernard Lyon 1 et après validation des protocoles par le Comité d'Ethique CECCAPP (Comité d'Evaluation Commun au Centre Léon Bérard à l'Animalerie de transit de l'ENS au PBES et au laboratoire P4) en Juillet 2013.

10.1. Xénogreffes

Les animaux utilisés sont des souris femelles athymiques nude âgées de 6 semaines (Laboratoire Charles River). 3x10⁶ cellules SQ20B ont été injectées par voie sous-cutanée, côté interne de la patte postérieure gauche des souris. La xénogreffe est effectuée avec des animaux sous anesthésie totale par isofluorane.

10.2. Traitements et irradiation des souris

Huit groupes correspondant à des conditions de traitement différentes ont été testés et les souris de chaque groupe ont été choisies après randomisation (Figure 39) : groupe Control (n = 11), groupe 10 Gy (n = 8), groupe ABT-737 (n = 11), groupe ABT-737 + 10 Gy (n = 7), groupe Cisplatine (n = 7), groupe Cisplatine + 10 Gy (n = 9), groupe ABT-737 + Cisplatine (n = 6) et groupe ABT-737 + Cisplatine + 10 Gy (n = 7).

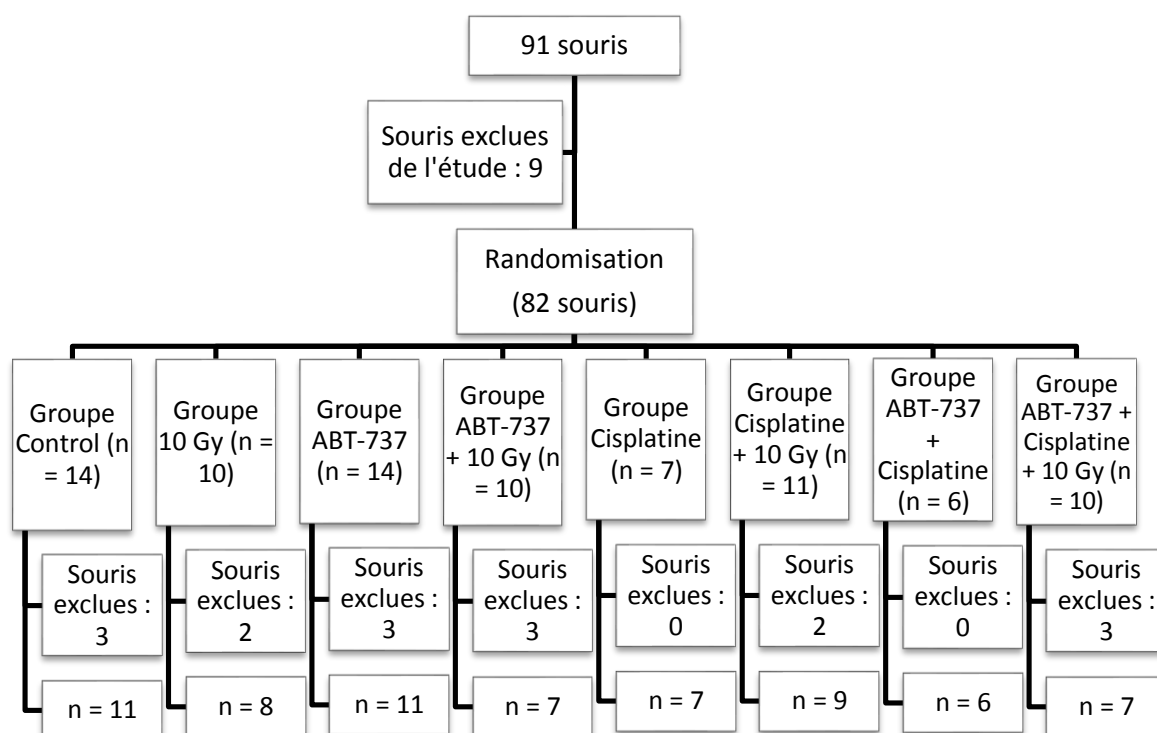


Figure 39 : Diagramme de randomisation.

Avant de réaliser la randomisation des souris, 9 souris ont été exclues de l'étude en raison de leur faible volume tumoral (Volume tumoral < 60 cm³). La randomisation et les traitements ont donc été réalisés sur 82 souris. A la suite des traitements et lors de leur suivi, certaines souris ont été exclues de l'étude pour différentes raisons (œdème important empêchant une mesure correcte du volume tumoral, nécrose partielle de la tumeur, volume tumoral > 400 cm³ au premier jour post-traitement).

Trois semaines après la xénogreffe, les souris ont subi un traitement correspondant à leur groupe, cela pendant cinq jours consécutifs :

- **Groupe Control** : **tous les jours** : injection de DMSO à 2% dans du sérum physiologique en injection intrapéritonéale (IIP) ;

- Groupe 10 Gy : **tous les jours** : injection de DMSO à 2% dans du sérum physiologique en IIP, suivi d'une irradiation de la tumeur à 2 Gy ;
- Groupe ABT-737 : **tous les jours** : injection d'ABT-737 à 20 mg/kg dans du sérum physiologique en IIP ;
- Groupe ABT-737 + 10 Gy : **tous les jours** : injection d'ABT-737 à 20 mg/kg dans du sérum physiologique en IIP, suivi d'une irradiation de la tumeur à 2 Gy ;
- Groupe Cisplatine : **premier jour de la semaine** : injection de Cisplatine à 2 mg/kg + DMSO 2% dans du sérum physiologique en IIP ; **les jours suivants**, injection de DMSO à 2% dans du sérum physiologique en IIP ;
- Groupe Cisplatine + 10 Gy : **premier jour de la semaine** : injection de Cisplatine à 2 mg/kg + DMSO 2% dans du sérum physiologique en IIP, suivi d'une irradiation de la tumeur à une dose de 2 Gy ; **les jours suivants**, injection de DMSO à 2% dans du sérum physiologique en IIP, suivi d'une irradiation de la tumeur à une dose de 2 Gy ;
- Groupe ABT-737 + Cisplatine : **premier jour de la semaine** : injection d'ABT-737 à 20 mg/kg et de Cisplatine à 2 mg/kg dans du sérum physiologique en IIP ; **les jours suivants**, injection d'ABT-737 à 20 mg/kg dans du sérum physiologique en IIP ;
- Groupe ABT-737 + Cisplatine + 10 Gy : **premier jour de la semaine** : injection d'ABT-737 à 20 mg/kg et de Cisplatine à 2 mg/kg dans du sérum physiologique en IIP, suivi d'une irradiation de la tumeur à une dose de 2 Gy ; **les jours suivants**, injection d'ABT-737 à 20 mg/kg dans du sérum physiologique en IIP, suivi d'une irradiation de la tumeur à une dose de 2 Gy.

L'irradiation des souris se fait sous anesthésie totale par l'isofluorane et par le X-rad 320 (PXi, USA) qui est également utilisé pour l'irradiation des cellules.

10.3. Suivi de l'évolution tumorale

Pendant la semaine de traitement, le poids corporel des souris a été vérifié chaque jour afin de détecter une éventuelle intolérance aux traitements.

L'aspect de la tumeur, le volume tumoral, ainsi que le poids corporel de chaque souris sont vérifiés 2 à 3 fois par semaine pendant 6 semaines après le traitement. Le volume tumoral est calculé selon la formule :

$$\text{Volume tumoral} = 0,5236 (H \times L^2)$$

avec :

- H = la hauteur de la tumeur (paramètre le plus élevé) ;
- L = la largeur de la tumeur (paramètre le plus faible).

10.4. Considérations éthiques

Une attention particulière a été prise sur l'observation de la douleur des souris en ajoutant du paracétamol dans l'eau de boisson en fin de protocole. De plus, des points limites à l'expérimentation ont été mis en œuvre, l'atteinte d'un de ces points aboutissant au sacrifice de l'animal concerné. Les points limites fixés sont la perte de plus de 10% du poids initial et/ou un volume tumoral supérieur ou égal à 1 200 cm³. En outre, une ulcération de la tumeur ou une atteinte de la motricité de l'animal font également partie des points limites fixés, bien que nous n'ayons pas observé ces phénomènes dans notre étude.

11. Analyses statistiques

Chaque expérience est réalisée minimum 2 fois en triplicats. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le test t de Student. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur standard. Les résultats sont significatifs lorsque la valeur p est inférieure à 0,05 (représenté par *). Lorsque la valeur p est inférieure à 0,01, les résultats sont représentés par ** et lorsqu'elle est inférieure à 0,001, les résultats sont représentés par ***.

Résultats et Discussion

Partie 1 : Etude de l'inhibition des protéines Bcl-2 et Bcl-X_L en combinaison avec l'irradiation

1. Relation entre l'expression des protéines de la famille Bcl-2 et la réponse à l'ABT-737 de différentes lignées cellulaires

Deux études, l'une portant sur le cancer du poumon à petites cellules (Hauck *et al.*, 2009) et l'autre portant sur les hépatocarcinomes (Ni *et al.*, 2014), ont récemment montré l'existence d'une corrélation entre l'expression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et la réponse cellulaire à l'ABT-737. Dans ce contexte, le premier objectif de notre travail a été d'évaluer la sensibilité de différentes lignées cellulaires issues de carcinomes épidermoïdes des VADS à l'ABT-737. Les quatre lignées cellulaires étudiées (SQ20B, Cal33, Cal27 et SCC61) sont de radiosensibilité graduelle et se caractérisent par des sensibilités différentes à l'ABT-737, avec des IC₅₀ allant de 2,28 µM pour la lignée SCC61 à 14,56 µM pour la lignée SQ20B (Tableau 11). De plus, si l'on compare la radiosensibilité mesurée par la fraction de survie à 2 Gy (SF₂), et la sensibilité des lignées à l'ABT-737 mesurée par l'IC₅₀, on constate qu'il existe une bonne corrélation entre ces 2 paramètres (Figure 40.A. ; R² = 0,861). Ce résultat confirme, sur nos lignées issues de cancers des VADS, le lien existant entre chimio- et radorésistance, comme dans de nombreux autres cancers, et qui justifie, entre autres, l'utilisation d'une chimiothérapie d'induction (voir partie I.3.3. de Bibliographie).

Parallèlement, l'expression de différentes protéines de la famille Bcl-2 a été déterminée pour chacune de ces quatre lignées cellulaires (Tableau 11). Certaines études (Hauck *et al.*, 2009 ; Ni *et al.*, 2014) ont montré l'existence d'une corrélation entre l'expression de Bcl-2 et la sensibilité à l'ABT-737. Cependant, dans les quatre lignées issues de cancers des VADS utilisées au cours de ce travail, nous n'avons pas trouvé de lien évident entre l'IC₅₀ de l'ABT-737 et l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 (coefficient de corrélation R² = 0,180) ou Mcl-1 (R² = 0,585), ainsi que l'expression des protéines pro-apoptotiques Bax (R² = 0,104), PUMA (R² = 0,100), Noxa (R² = 0,141) et Bim_{EL} (R² = 0,192). En revanche, nous avons trouvé une excellente corrélation entre la sensibilité des quatre lignées à l'ABT-737 et l'expression de

la protéine pro-apoptotique effectrice Bak (Figure 40.B. et C. ; $R^2 = 0,930$) alors qu'une tendance est montrée avec l'expression de Bcl-X_L (Figure 40.B. et D. ; $R^2 = 0,799$).

Lignées cellulaires		SQ20B	Cal33	Cal27	SCC61
SF2		0,76	0,67	0,47	0,39
IC50 ABT-737 (μ M)		14,56	13,44	9,48	2,28
Expression des différentes protéines de la famille Bcl-2 (densité relative à l'expression de l' α -tubuline ou de la GAPDH) ($\cdot 10^{-7}$)					
Anti-apoptotiques	Bcl-2	1,11	4,28	1,89	3,94
	Bcl-x _L	4,52	2,98	3,71	1,21
	Mcl-1	4,70	7,66	5,85	2,09
Pro-apoptotiques effectrices	Bax	3,20	7,40	8,23	2,84
	Bak	1,44	1,53	2,15	2,51
Pro-apoptotique activatrice	PUMA	0,70	0,89	0,40	0,98
	Noxa	0,81	3,30	7,69	3,86
	Bim	0,112	0,131	0,204	0,153

Tableau 11 : Caractéristiques des différentes lignées cellulaires étudiées.

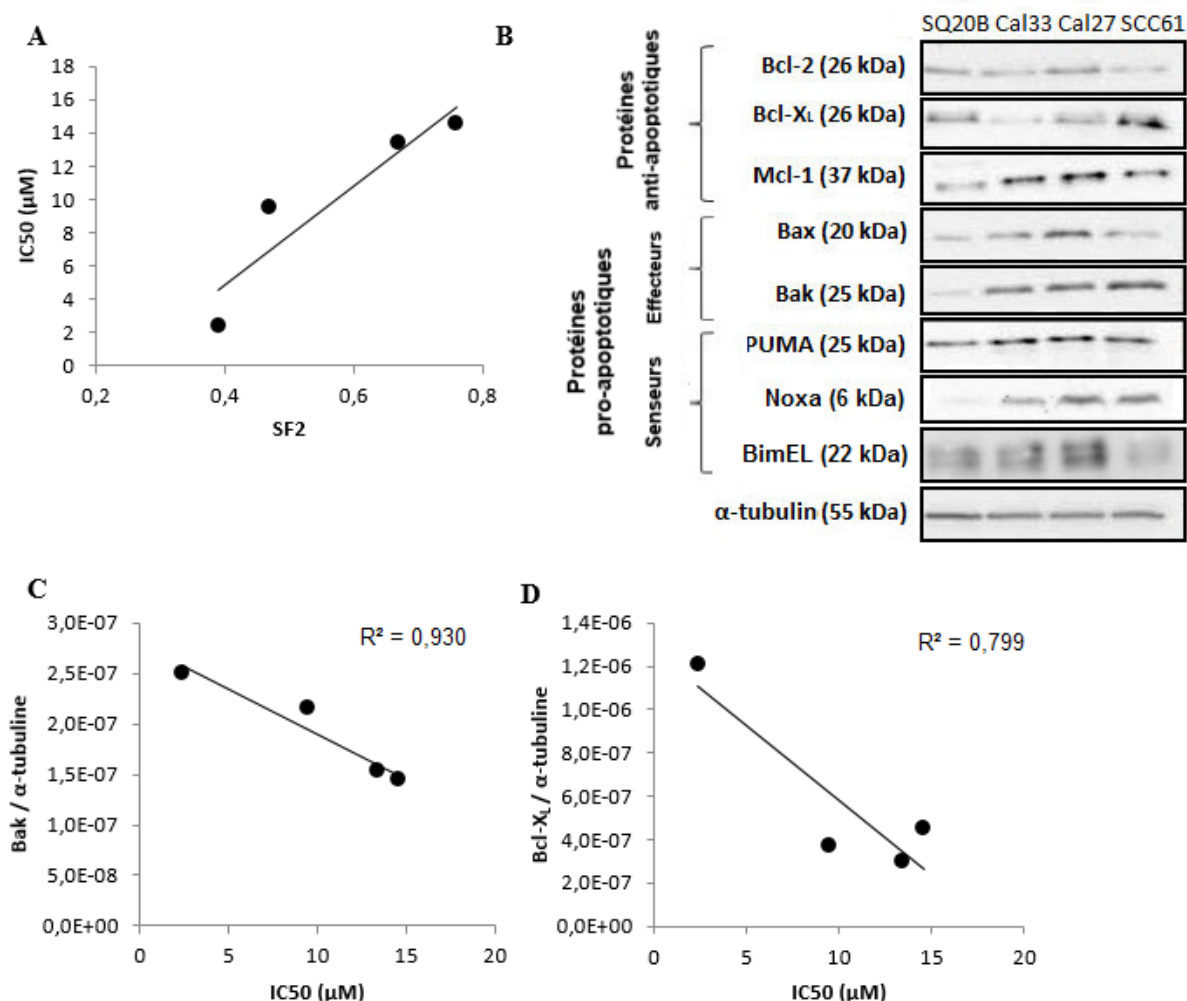


Figure 40 : Etude de la corrélation entre la sensibilité à l'ABT-737 et différents paramètres concernant les lignées issues des VADS.

A. Graphique représentant l'IC₅₀ de l'ABT-737 (μM) en fonction de la SF2 de chaque lignée cellulaire issue de carcinomes épidermoïdes des VADS. **B.** Expression des protéines de la famille Bcl-2 dans les quatre lignées cellulaires étudiées au niveau basal. **C.** Graphique représentant l'expression de Bak et **D.** l'expression de Bcl-X_L en fonction de l'IC₅₀ de l'ABT-737 (μM) pour chaque lignée cellulaire (R²_{Bak} = 0,930 ; R²_{Bcl-XL} = 0,799).

Cette première partie de notre travail montre une réelle hétérogénéité d'expression des protéines de la famille Bcl-2. Cette hétérogénéité d'expression a déjà été rapportée dans de nombreux cancers et est considérée comme étant le support de l'insensibilité totale ou partielle à la chimiothérapie (Luo *et al.*, 2000 ; Cotter, 2004 ; Thomadaki *et al.*, 2008 ; Kontos *et al.*, 2014) et de l'augmentation de la radiorésistance (Condon *et al.*, 2002 ; Skvara *et al.*, 2005 ; Li *et al.*, 2012). Cependant, compte-tenu de l'extrême complexité des interactions entre les différentes protéines de la famille Bcl-2, dont les membres sont

organisés en un réseau intriqué impliquant plusieurs compartiments subcellulaires, il est très difficile de déterminer pour une cellule donnée la contribution de chacune d'entre elle dans la destinée de cette cellule. Ainsi, les cellules exprimant le même sous-ensemble de protéines Bcl-2 mais en quantité différentes réagiront de façon différente aux stimuli apoptotiques (ici, l'irradiation ou le traitement par l'ABT-737). Il en découle donc que la sensibilité à l'ABT-737 ne peut pas être liée à un seul déterminant (Stamelos *et al.*, 2012) mais résulte d'un ensemble de paramètres dont l'expression relative des protéines de la famille Bcl-2 est une composante, au même titre que l'état métabolique de la cellule, son environnement hypoxique (qui doit être pris en compte *in vivo*), ect.

Toutefois, nos résultats nous permettent de suggérer qu'un index de sensibilité à l'ABT-737 fondé sur l'expression de Bak et de Bcl-X_L dans ces lignées, pourrait être utilisé comme cela a déjà été montré avec d'autres protéines dans la leucémie lymphoïde chronique (Al-Harbi *et al.*, 2011) ou dans le cancer du poumon à petites cellules (Nakajima *et al.*, 2014). Une étude complémentaire incluant un plus grand nombre de lignées ou sur une cohorte de patients permettrait d'affirmer cette tendance.

2. Effet de l'irradiation combinée à l'inhibition des protéines Bcl-2 et Bcl-X_L

Afin d'étudier l'effet biologique de la combinaison ABT-737/irradiation sur nos lignées, nous avons quantifié la mort cellulaire en déterminant le pourcentage de cellules présentes en phase sub-G1 du cycle cellulaire pour chacune d'entre elles (Figure 41). Pour trois des lignées cellulaires testées, le traitement à l'ABT-737 combiné à l'irradiation (ABT-737 + 10 Gy) augmente le nombre de cellules en phase sub-G1 comparativement aux conditions contrôles (Ctrl, 10 Gy, ABT-737) dès 24 heures après l'irradiation. En effet, pour la lignée SQ20B, on passe de 1,1% \pm 0,3% de cellules en phase sub-G1 pour les irradiées à 5,4% \pm 0,9% après traitement par l'ABT-737 et irradiation. Les résultats vont dans le même sens pour les Cal33 qui passent de 5,9% \pm 1,6% de cellules en sub-G1 (irradiées) à 18,1% \pm 4,8% pour les cellules traitées et irradiées. Enfin, la lignée SCC61 présente également une différence significative du nombre de cellules en sub-G1 entre les cellules irradiées (3,3% \pm 1,4%) et les cellules traitées par l'ABT-737 et irradiées (9,7% \pm 0,8%). Seule la lignée Cal27 ne présente pas d'augmentation significative 24 heures après traitement.

La proportion de cellules en phase sub-G1 continue à augmenter de façon significative pour des temps plus tardifs (72 heures et 120 heures après irradiation) et ceci pour les quatre lignées étudiées. Pour les SQ20B, à 5 jours après irradiation, le nombre de cellules en phase sub-G1 passe de 27,5% \pm 3,7% (irradiation seule) à 63,2% \pm 10,1% en présence d'ABT-737. Pour les Cal33, ces pourcentages passent de 54,0% \pm 9,1% à 73,0% \pm 3,1%. Pour les Cal27, il y a 28,0% \pm 2,0% de cellules en sub-G1 après irradiation à 10 Gy et 47,5% \pm 4,6% après double traitement. Enfin, les SCC61 voient leur pourcentage de cellules en sub-G1 augmenter de 57,9% \pm 4,8% lors de l'irradiation à 84,0% \pm 6,6% en présence d'ABT-737.

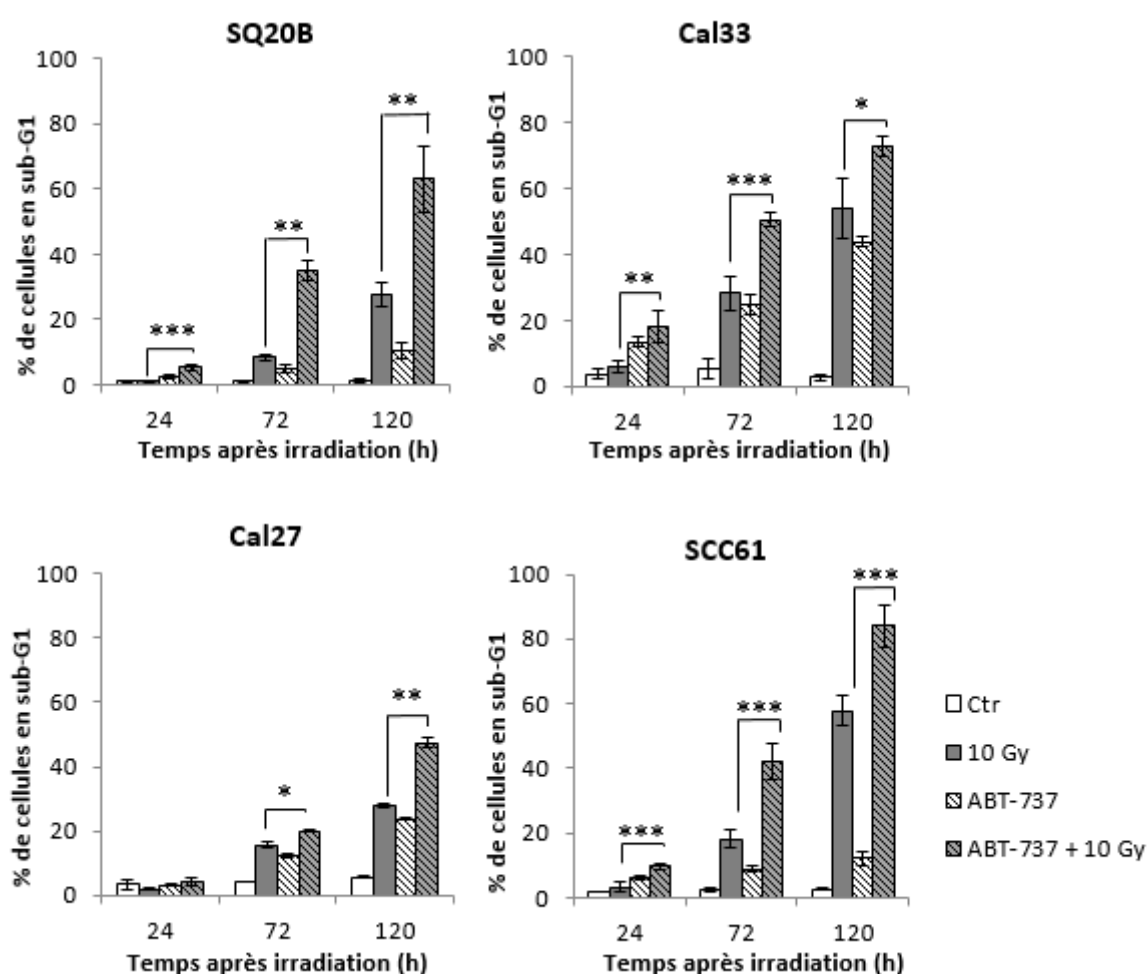


Figure 41 : Etude du pourcentage de cellules en phase sub-G1 sur 4 lignées cellulaires issues de carcinomes épidermoïdes des VADS.

Ces résultats suggèrent que la combinaison des deux traitements induit d'une part, une augmentation de la mort cellulaire précoce (après 24 heures) qui correspondrait à une entrée en apoptose précoce et d'autre part une augmentation de la mort cellulaire tardive (72 heures et 120 heures post-irradiation), qui pourrait correspondre à une catastrophe mitotique suivie d'une entrée en apoptose tardive.

3. L'ABT-737 a une action synergique avec l'irradiation

Pour la suite de l'étude, nous avons décidé de travailler avec la lignée cellulaire SQ20B, qui est la plus résistante et qui est historiquement celle qui a été la plus étudiée au laboratoire (Alphonse *et al.*, 2004 ; Bionda *et al.*, 2007 ; Aloy *et al.*, 2008 ; Hadchity *et al.*, 2009 ; Maalouf *et al.*, 2009 ; Boivin *et al.*, 2011 ; Hanot *et al.*, 2012). Afin de confirmer l'effet rapporté précédemment, une étude de survie clonogénique a été réalisée en combinant le traitement à l'ABT-737 et l'irradiation (Figure 42). Nous observons ainsi une radio-sensibilisation de la lignée SQ20B qui se traduit par diminution de la fraction de survie à 2 Gy (SF2) : de 0,81 pour les cellules contrôle à 0,60 pour les cellules ayant subi un prétraitement à l'ABT-737.

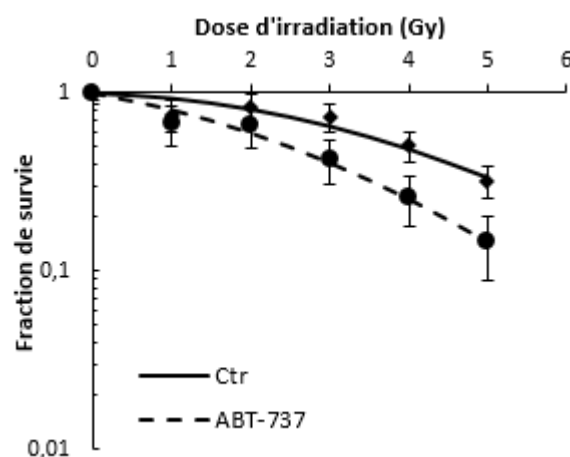


Figure 42 : Survies clonogéniques de la lignée cellulaire SQ20B.

Ctr : sans traitement ; ABT-737 : avec un prétraitement à l'ABT-737 (10 μ M). La fraction de survie à 2 Gy (SF2) des cellules non traitées (Ctr) est de 0,81 et elle diminue à 0,60 après prétraitement (ABT-737).

De plus, une analyse isobolographique (voir partie 1.4.1. de Matériels et Méthodes) de l'interaction entre l'ABT-737 et les rayonnements ionisants a été réalisée à l'aide des données

fournies par ces survies clonogéniques. Les résultats montrent un effet additif entre les deux traitements à 1 Gy, puis un effet synergique de 2 Gy jusqu'à 5 Gy (Tableau 12) quelle que soit l'efficacité cytotoxique (50% ou 10% de survie).

<i>Dose d'irradiation (Gy)</i>	<i>Analyse isobologique</i>	
	10 % survie	50 % survie
1	Additif	Additif
2	Synergique	Synergique
3	Synergique	Synergique
4	Synergique	Synergique
5	Synergique	Synergique

Tableau 12 : Etude isobologique des survies clonogéniques.

4. Etude de l'activation de l'apoptose en réponse au traitement combiné

Afin de comprendre le mécanisme d'action de la combinaison ABT-737/irradiation et d'évaluer l'implication de l'apoptose dans l'augmentation de la mort cellulaire démontrée dans la lignée SQ20B, différentes méthodes ont été utilisées.

Tout d'abord, le test TUNEL a permis de montrer une augmentation significative ($p < 0,05$) à partir de 72 heures après irradiation du pourcentage de cellules entrant en apoptose (SQ20B irradiées : $12,8\% \pm 5,3\%$ et SQ20B traitées et irradiées : $29,2\% \pm 2,1\%$; Figure 43.A). De plus, la proportion de cellules positives au test TUNEL est comparable au pourcentage de cellules entrant en phase sub-G1 aux même temps de cinétique après irradiation (72 heures après irradiation, SQ20B irradiées : sub-G1 : $8,5\% \pm 0,9\%$ et SQ20B traitées et irradiées : $35,0\% \pm 3,2\%$; Figure 41), ce qui suggère que la majorité des cellules en phase sub-G1 correspondent à des cellules en apoptose.

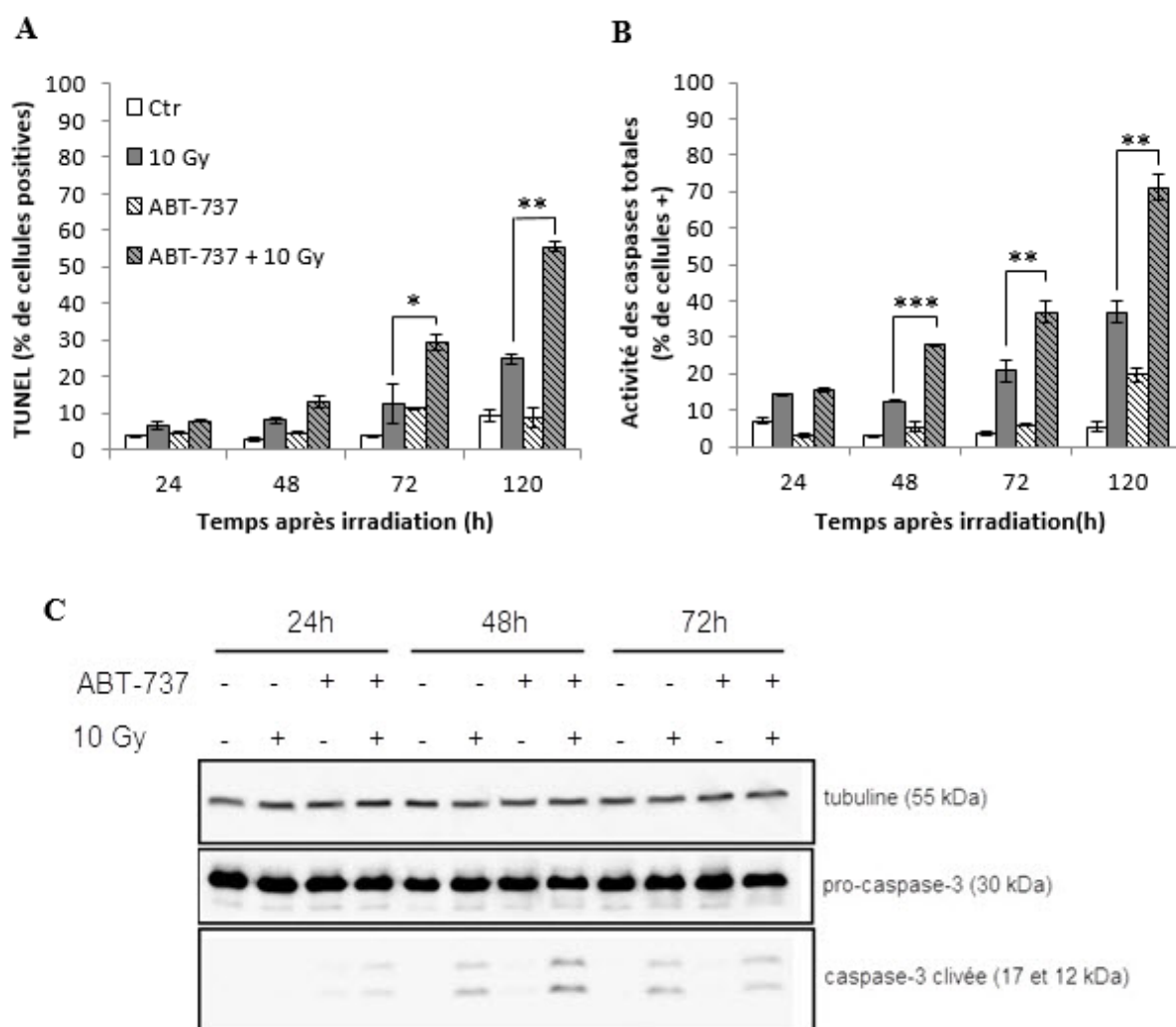


Figure 43 : Etude de l'entrée en apoptose des cellules SQ20B comme conséquence du traitement combiné ABT-737 / irradiation à 10 Gy.

A. Cinétique du pourcentage de cellules positives au test TUNEL. **B.** Cinétique de l'activité des caspases totales. **C.** Activation de la pro-caspase-3 en caspase-3 active au cours du temps.

Ceci est confirmé par le test mesurant l'activation des caspases totales. En effet, il y a une augmentation significative du nombre de cellules dont les caspases sont activées, augmentation qui débute 48 heures après irradiation (SQ20B irradiées : $12,5\% \pm 0,2\%$ et SQ20B traitées et irradiées : $27,9\% \pm 0,4\%$; Figure 43.B.). En outre, notre étude cinétique montre que l'activation des caspases dans les cellules SQ20B a bien lieu en amont de leur entrée en apoptose.

Enfin, l'activation spécifique de la pro-caspase-3 en caspase-3 active a été vérifiée par Western blot (Figure 43.C.). Nous avons montré qu'il y a activation de cette caspase effectrice

dès 24 heures lors de la combinaison du traitement et de l'irradiation, alors qu'elle n'apparaît qu'à partir de 48 heures lors de l'irradiation seule, et de façon beaucoup moins importante qu'avec la combinaison avec l'ABT-737.

5. Le traitement à l'ABT-737 induit une translocation de la protéine Bax à la mitochondrie

Le rôle principal des protéines anti-apoptotiques est d'inhiber les protéines pro-apoptotiques effectrices, Bax et Bak (Huang *et al.*, 1998), et les protéines BH3-only activatrices (Letai *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2006). De ce fait, l'inhibition stérique des premières par l'ABT-737 devrait permettre de libérer les secondes et de favoriser ainsi l'entrée en apoptose des cellules. Afin d'évaluer la libération et l'activation de ces protéines, pro-apoptotiques, nous avons visualisé la translocation de la protéine Bax à la mitochondrie. En effet, cette protéine est localisée à l'état basal dans le cytoplasme (Suzuki *et al.*, 2000) ou est liée à la MEM par des interactions faibles avec des protéines anti-apoptotiques. Nous avons donc réalisé une extraction mitochondriale suivie d'un traitement alcalin permettant de détacher les protéines liées aux mitochondries par des interactions faibles. Un Western blot a été ensuite réalisé afin de visualiser la translocation de Bax vers la mitochondrie.

Comme le montre la Figure 44, la translocation de Bax à la mitochondrie débute modestement à partir de 24 heures pour les cellules irradiées et augmente fortement après traitement par l'ABT-737, combiné ou non à l'irradiation. A partir de 48 heures, la translocation de Bax est très augmentée suite au double traitement. Ces résultats montrent que le traitement par l'ABT-737, en inhibant Bcl-2 et Bcl-X_L, permet la translocation de Bax vers la mitochondrie dès 24 heures après le début du traitement, phénomène qui est amplifié par l'irradiation. L'irradiation, seule, provoque, quant à elle, une translocation modeste de Bax à la mitochondrie. Nos résultats confirment donc l'implication de Bax dans le déclenchement de l'apoptose après traitement des cellules avec l'ABT-737 et l'irradiation.

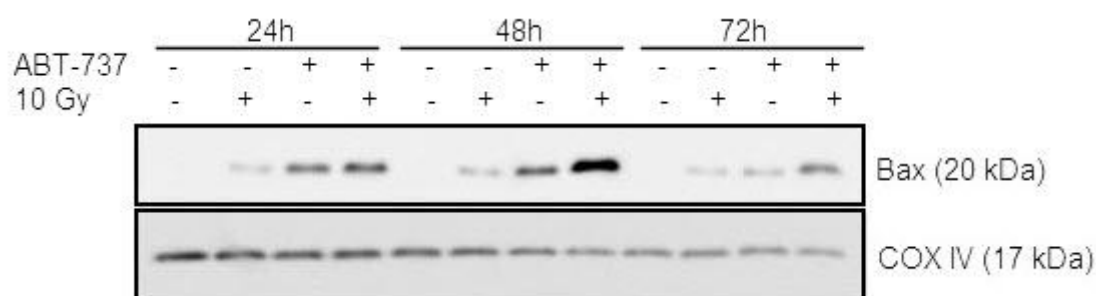


Figure 44 : Translocation de Bax à la mitochondrie.

Alors que de nombreux travaux ont démontré que l'ABT-737 pouvait augmenter l'efficacité de nombreuses molécules utilisées en chimiothérapie, ceci dans des cancers très divers [cancers lymphoïdes (Touzeau *et al.*, 2011 ; Song *et al.*, 2015), carcinome ovarien (Jain *et al.*, 2014), mélanome (Reuland *et al.*, 2011), cancer colorectal (Raats *et al.*, 2011), adénocarcinome du poumon (Qian *et al.*, 2009) ou encore cancer des VADS (Li *et al.*, 2009)] son association avec la radiothérapie n'a pour l'instant été testée que dans le cancer du sein (Li *et al.*, 2012 ; Wu *et al.*, 2014) mais jamais dans les cancers issus des VADS. Nos résultats démontrent donc pour la première fois le fort potentiel thérapeutique de cette association. Cette association ABT-737/irradiation permet de déclencher la mort cellulaire par apoptose dans la lignée la plus résistante, SQ20B. C'est la voie intrinsèque de l'apoptose, impliquant la mitochondrie, qui est déclenchée en réponse à cette association avec translocation de la protéine effectrice Bax à la mitochondrie. L'ABT-737, utilisé seul, n'est en revanche pas capable d'induire l'apoptose dans nos lignées VADS, contrairement à ce qui a pu être rapporté dans des cellules leucémiques (Baev *et al.*, 2014), le chondrosarcome (Morii *et al.*, 2014) ou le rétinoblastome (Allaman-Pillet *et al.*, 2013) par exemple. Ceci souligne la complexité des mécanismes impliquant les divers membres de la famille Bcl-2 dans la régulation de l'apoptose. En effet, en s'abstenant du contexte cellulaire, il a été montré que l'ABT-737 est capable d'induire le relargage de protéines pro-apoptotiques à partir de mitochondries isolées (Buron *et al.*, 2010) mais pas dans toutes les lignées cellulaires tumorales testées. La perméabilisation de la membrane mitochondriale dépend dans ce cas si des monomères de Bax et Bak sont déjà présentes dans la cellule et sont capables de s'oligomériser à la MEM.

6. Mécanisme impliqué lors de l'inhibition des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2

6.1. Le traitement à l'ABT-737 n'augmente pas les dommages à l'ADN après irradiation

Un des mécanismes d'action fondamental des rayonnements ionisants concerne l'induction de dommages à l'ADN nucléaire. Les relations entre les protéines de la famille Bcl-2 et la réparation de l'ADN nucléaire après son altération par des agents génotoxiques n'ont fait l'objet que d'un nombre très limité de travaux. Parmi eux, Kumar *et al.* (2010) ont montré l'existence d'une corrélation entre l'expression de Bcl-2 dans diverses lignées leucémiques ou de cancer du poumon et l'efficacité des systèmes de réparation des CDB (particulièrement le système NHEJ) dans ces lignées. Les auteurs ont cependant proposé que ces observations sont liées à l'existence d'interactions entre les protéines Ku et la protéine Bcl-2 localisée dans le noyau (Portier & Taglialatela, 2006), les protéines Ku étant séquestrées par Bcl-2 et les empêchant de ce fait de se lier à l'ADN. Les travaux de Dutta *et al.* (2012), quant à eux, ont démontré dans les lignées leucémiques l'existence d'une interaction entre la protéine Bcl-2 et la protéine PARP1, interaction qui bloque cette dernière et inhibe la voie de réparation des CSB dépendant de PARP. L'utilisation de l'ABT-737 dans ces lignées a en effet permis de montrer que l'inhibition de cette interaction Bcl-2/PARP1 permet de restaurer l'activité enzymatique de PARP1 et de promouvoir la voie de mort non apoptotique qui y est associée.

Afin de déterminer si l'inhibition de Bcl-2 par l'ABT-737 pouvait influencer la reconnaissance des CDB après irradiation, nous avons réalisé une cinétique de marquage de la protéine 53BP1 dans la lignée SQ20B (Figure 45.A). Cette protéine est en effet recrutée par ATM très rapidement au niveau CDB après un stress génotoxique (Ward *et al.*, 2003). Nos résultats montrent une augmentation du nombre de foci avec un pic qui culmine 30 minutes après irradiation suivi d'une baisse qui se poursuit jusqu'à 24 heures. En présence d'ABT-737, le nombre de foci maximal atteint à 30 minutes est plus faible (24 ± 2 foci *versus* 32 ± 4 foci pour le contrôle). Cependant, les foci 53BP1 résiduels, qui témoignent des cassures non réparées, ne sont pas modifiés par l'ABT-737, 24 heures après irradiation. Ces résultats indiquent que l'ABT-737 ne modifie pas le niveau de reconnaissance/réparation des CDB par 53BP1 et donc les lésions sub-létales associée. Cependant, on peut noter une modification de la cinétique de reconnaissance/réparation de ces CDB au cours du temps qui semble plus lente dès 1 heure après irradiation.

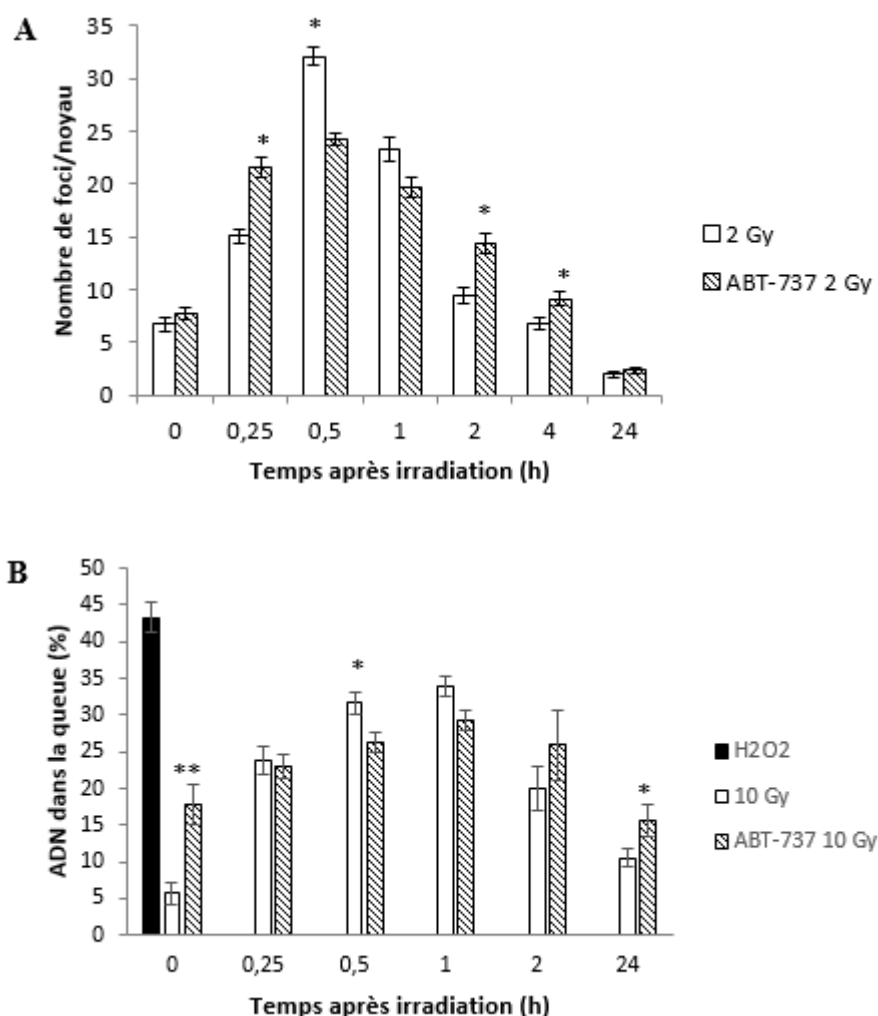


Figure 45 : Etude des dommages à l'ADN.

A. Cinétique du nombre de foci 53BP1 dans les cellules SQ20B après traitement et / ou irradiation à 2 Gy. **B.** Cinétique du % d'ADN présent dans la queue des Comètes.

Nous avons dans un deuxième temps réalisé le test des « comètes » en conditions neutres, qui permet de détecter principalement les CDB (Figure 45.B.). Contrairement au marquage réalisé précédemment avec la protéine 53BP1, le test des comètes en milieu neutre révèle un pourcentage plus important d'ADN dans la queue, donc de CDB après traitement par l'ABT-737 et avant irradiation (Temps 0 minutes : 10 Gy : $5,7\% \pm 1,5\%$; ABT-737 10 Gy : $17,9\% \pm 2,7\%$; $p < 0,01$). Cependant, le taux de CDB 15 minutes après irradiation, n'est pas modifié par l'ABT-737 mais un plus faible pourcentage est retrouvé à 30 minutes lors du traitement par l'ABT-737. Enfin, nous observons un nombre de CDB légèrement plus grand à

24 heures lors du double traitement (10 Gy : 10,6% \pm 1,3% ; ABT-737 10 Gy : 15,6% \pm 2,2% ; $p < 0,05$) ce qui montre que le pré-traitement par l'ABT-737 interfère avec les systèmes de reconnaissance/réparation des CDB.

En résumé, le pré-traitement des cellules par l'ABT-737 ne modifie pas de façon spectaculaire la réparation des dommages de l'ADN nucléaire engendrés par son association avec l'irradiation. On peut toutefois noter que l'ABT-737 semble moduler la vitesse de réparation des CDB en la ralentissant dans nos conditions expérimentales. Toutefois, ces résultats préliminaires demandent confirmation, en y associant toutes les conditions expérimentales classiquement utilisées avec le test des Comètes (conditions basiques pour l'étude des CSB, avec Formamidopyrimidine-DNA Glycosylase (Fpg) pour l'étude des dommages de bases).

6.2. Le traitement à l'ABT-737 augmente le stress oxydant intra-mitochondrial

En dehors de leur rôle parfaitement décrit dans le contrôle et la régulation de la mort apoptotique, il a été montré que certaines protéines de la famille Bcl-2 participent à la destinée d'une cellule *via* d'autres mécanismes. Parmi ceux-ci, on peut citer le rôle joué par Bcl-2 dans la régulation de la balance redox intracellulaire (Kowaltowski & Fiskum, 2005 ; Krishna *et al.*, 2011). Dans ce contexte, nous avons étudié l'effet de l'ABT-737 combiné ou non à l'irradiation sur les altérations mitochondriales liées à des modifications du stress oxydant intra-mitochondrial.

6.2.1. *Mise en évidence d'altérations des mitochondries*

Dans un premier temps, nous avons évalué les dommages mitochondriaux obtenus après traitement combiné associant l'ABT-737 et l'irradiation par la mesure du potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) qui est un témoin tardif du dysfonctionnement mitochondrial précédant l'entrée de la cellule en apoptose. Comme le montre la (Figure 46.A.), l'irradiation seule provoque une altération des mitochondries (augmentation du % de cellules dont le $\Delta\Psi_m$ est modifié) dès 48 heures, cette augmentation étant beaucoup plus importante après traitement par l'ABT-737 et irradiation (Ctr : 1,85% \pm 0,21% ; 10 Gy : 11,90% \pm 1,55% ; ABT-737 + 10 Gy : 21,20% \pm 6,09%). Cette différence se confirme et s'amplifie pour des temps plus tardifs : à 72 heures, on a 15,64% \pm 2,23% de cellules à faible $\Delta\Psi_m$ après irradiation seule contre 29,37% \pm 6,17% après traitement combiné. Le pourcentage de cellules dont les mitochondries sont endommagées monte à plus de 65%, 120 heures après le double traitement.

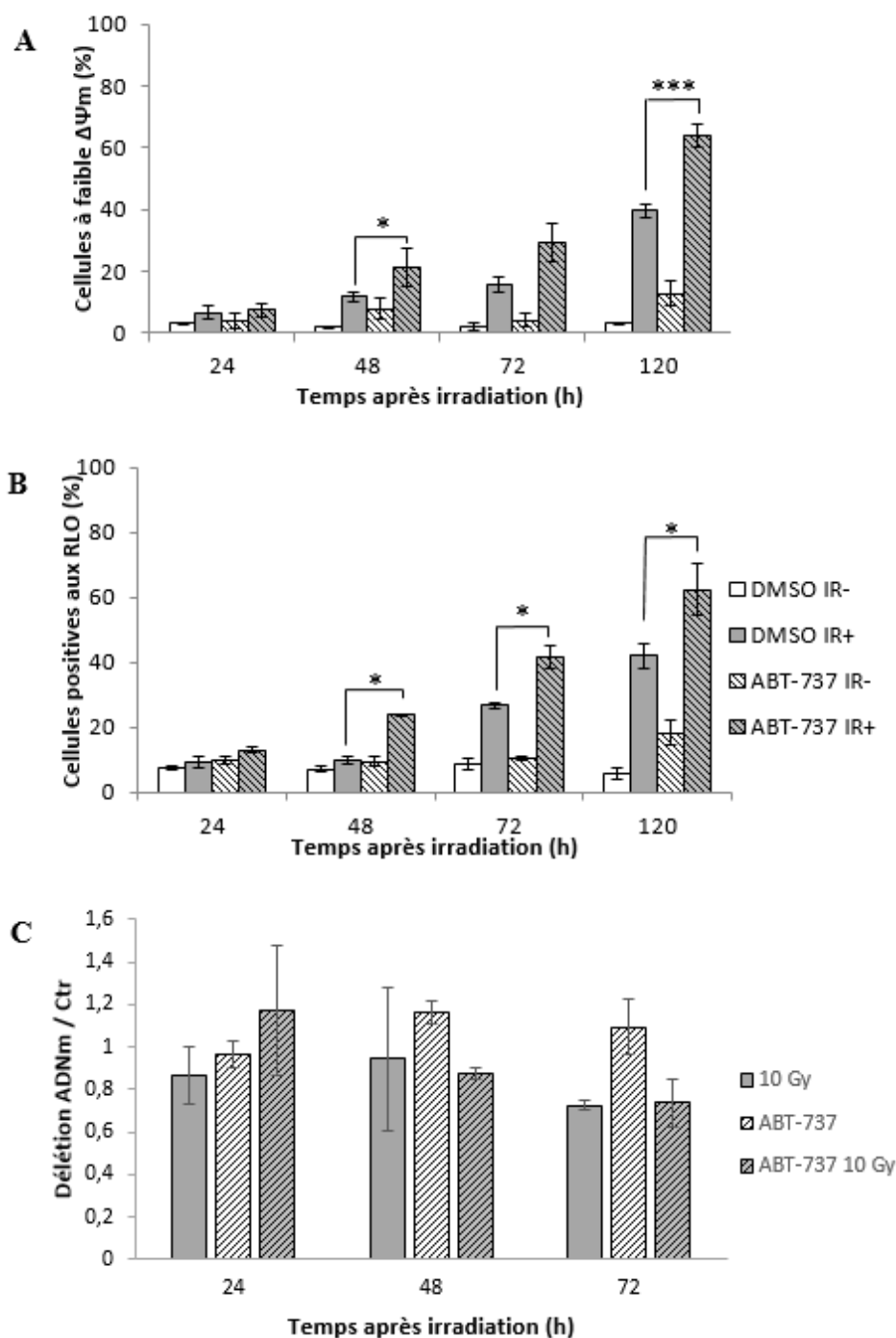


Figure 46 : Etude des altérations mitochondriales.

A. Etude de la chute du potentiel de membrane ($\Delta\Psi_m$). **B.** Etude de la production d'ERO formées par la chaîne respiratoire. **C.** Etude du taux de délétion de l'ADN mitochondrial.

En parallèle, nous avons mesuré, la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO), produits par la mitochondrie, et qui sont relargués dans le cytosol une fois que le $\Delta\Psi_m$ n'est plus maintenu et donc que la perméabilité des membranes mitochondriales est modifiée.

On constate alors que parallèlement à la chute du $\Delta\Psi_m$, on a une augmentation du taux d'ERO produits par la mitochondrie, ceci de façon légèrement plus précoce après double traitement (Figure 46.B.) (à 48 heures, SQ20B 10 Gy : 9,3% \pm 1,0% ; SQ20B ABT-737 10 Gy : 26,6% \pm 0,5% ; $p < 0,05$). Ces premiers résultats montrent que le traitement combinant l'ABT-737 à l'irradiation induit un dysfonctionnement mitochondrial impliquant une modification de l'équilibre redox intra-mitochondrial.

En dehors des lipides et des protéines membranaires, l'ADN mitochondrial (ADNmt) est également une cible privilégiée des attaques oxydantes. Dans ce but, nous avons évalué l'impact de notre traitement combiné sur l'ADNmt en évaluant la grande délétion commune de 4 977 paires de bases de l'ADNmt comme témoin d'un stress oxydant intra-mitochondrial (Niu *et al.*, 2012) et dont les conséquences sont une profonde modification du fonctionnement de la chaîne respiratoire, aboutissant à une génération massive d'ERO et d'une perte du $\Delta\Psi_m$. Les résultats obtenus ne donnent pas de variations significatives dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées (Figure 46.C.). Ces résultats, tout à fait préliminaires, n'ont pour l'instant pas pu être répétés et demandent une mise au point minutieuse du protocole expérimental que nous n'avons pas eu le temps de mener à bien.

6.2.2. Mesure de l'état redox intra-mitochondrial

Parmi les rôles moins connus des protéines de la famille Bcl-2 concernant la balance redox, quelques travaux ont également montré l'implication des protéines Bcl-2 et Bcl-X_L dans le transport du principal antioxydant non enzymatique intracellulaire, le glutathion réduit (GSH) depuis son lieu de synthèse, à savoir le cytosol, vers la mitochondrie (Zimmermann *et al.*, 2007 ; Wilkins *et al.*, 2012). Nous avons donc voulu vérifier si le stress oxydant intra-mitochondrial qui augmente après le traitement combiné s'accompagne d'une modification du taux de GSH intra-mitochondrial. Si l'ABT-737 inhibe le transport du GSH dans notre modèle cellulaire, nous devrions mettre en évidence une corrélation entre la diminution du GSH et l'apparition des ERO après traitement.

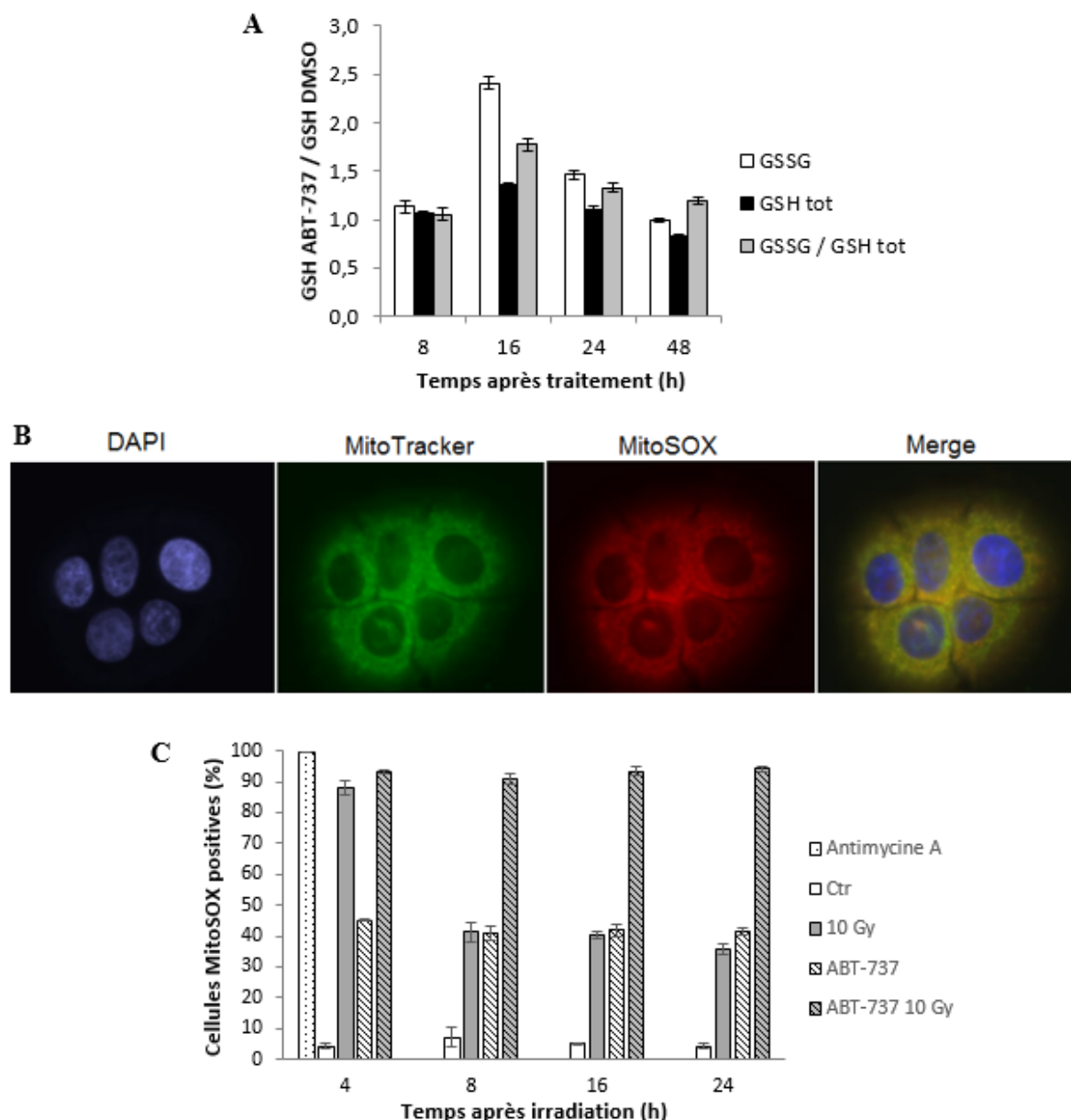


Figure 47 : Etude du stress oxydant précoce mitochondrial après traitement par l'ABT-737.

A. Dosage du GSSG ou du GSH dans la fraction mitochondriale. **B.** Production d'anions superoxydes mitochondriaux par microscopie optique par des SQ20B après 1 heure de traitement par l'antimycine A. En bleu : marquage des noyaux par le DAPI ; en vert : marquage des mitochondries par le MitoTracker® Green ; en rouge : marquage des anions superoxydes par le MitoSOX™. **C.** Dosage de la production d'anions superoxydes par cytométrie de flux.

Le dosage du GSH mitochondrial a été réalisé sur des mitochondries isolées après fractionnement subcellulaire. On remarque que le traitement des cellules ne modifie que faiblement le taux de GSH mitochondrial au cours du temps (Figure 47.A.). De même, la

quantité de GSSG est légèrement augmentée, 16 heures après le traitement puis se normalise à 24 heures. Ces résultats indiquent qu'il n'y a apparemment pas de modification majeure du taux de GSH intra-mitochondrial. Ces résultats sont toutefois à interpréter avec précautions du fait du faible rendement en mitochondries obtenus après fractionnement cellulaire, rendement qu'il est difficile de normaliser de façon satisfaisante.

Parallèlement, nous avons voulu voir si le traitement des cellules à l'ABT-737 combiné à l'irradiation engendre une production précoce d'ERO et spécifiquement au niveau mitochondrial. Pour cela, nous avons quantifié la production d'anions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) dans les mitochondries grâce à la sonde MitoSOXTM spécifique de cet organite (Figure 47.B. et C.). Afin de confirmer par une autre approche le potentiel de la sonde MitoSOXTM pour la quantification des ERO générées, nous avons traité préalablement les cellules par de l'Antimycine A, un inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire, afin de favoriser la production d'ERO et donc de servir de témoin positif pour le marquage avec MitoSOXTM. La Figure 47.B. illustre le double marquage obtenu lors de ce traitement par l'Antimycine A avec la sonde MitoSOXTM en rouge qui coïncide bien avec le marquage mitochondrial obtenu grâce à la sonde verte MitoTracker®. Ce résultat nous permet d'affirmer que les résultats obtenus avec MitoSOXTM sont bien spécifiques et que nous pouvons l'utiliser pour une quantification des ERO par cytométrie de flux. Par cytométrie, on constate que le nombre de cellules positives au marquage par MitoSOXTM lors du traitement par l'Antimycine A est proche de 100% (Figure 47.C.), ce qui valide l'utilisation de cette sonde dans nos conditions expérimentales. 4 heures après irradiation, nous observons une forte augmentation du taux d'ERO dans la mitochondrie avec $88,1\% \pm 2,2\%$ de cellules positives. Ce taux redescend à 40% à partir de 8 heures et reste stable jusqu'à 24 heures. Le traitement par l'ABT-737 maintient un taux de stress oxydant relativement constant avec 40% de cellules positives. Enfin, le double traitement induit une forte production d' $O_2^{\bullet-}$ dans les mitochondries avec un nombre de cellules positives de plus de 90% et ceci dès 4 heures après irradiation.

Ces résultats tendent à montrer tout d'abord que l'irradiation induit un stress oxydant important et très précoce (4 heures) qui est partiellement inhibé par l'arsenal des défenses anti-oxydantes mitochondriales. Cependant, cette production ne retourne pas à l'état basal puisqu'elle se maintient pendant le temps de l'expérimentation.

6.2.3. Discussion

En dehors du rôle joué par Bcl-2 dans la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe au cours de l'apoptose, une autre activité anti-apoptotique de Bcl-2 a récemment été suggérée, à savoir son implication dans le métabolisme redox cellulaire (Low *et al.*, 2011 ; Chong *et al.*, 2014). Cette activité a permis de voir émerger une théorie pro-oxydante de la carcinogénèse qui repose sur l'existence d'une balance subtile entre deux espèces réactives de l'oxygène : le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les anions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$). Cette balance est régulée par les défenses anti-oxydantes et son déséquilibre va déterminer le devenir de la cellule. Si la balance penche en faveur des $O_2^{\bullet-}$, la cellule va augmenter momentanément ses défenses anti-oxydantes et favoriser la survie cellulaire alors que si elle penche en faveur d' H_2O_2 , la cellule va enclencher un programme de mort (voir partie IV.3.1.1. de Bibliographie). Nos résultats suggèrent que suite à un traitement par l'ABT-737 seul ou par l'irradiation seule, on maintiendrait bien la balance en faveur des $O_2^{\bullet-}$, donc plutôt pro-survie. L'association ABT/irradiation provoque l'apparition d'une quantité importante d' $O_2^{\bullet-}$ qui normalement devrait se transformer en H_2O_2 *via* la MnSOD (isoforme mitochondriale) et donc faire dévier la balance vers la mort cellulaire. Afin de vérifier cette hypothèse et de la concilier avec cette théorie pro-oxydante, un dosage de l'activité MnSOD aurait été utile, associé à une quantification d' H_2O_2 dans la mitochondrie. Ce dernier point sera difficile à vérifier car les outils disponibles (sondes fluorescentes) sont d'une spécificité discutable et la quantification spécifiquement mitochondriale (par la sonde Hyper par exemple ; Mishina *et al.*, 2013) nécessite une mise au point technique complexe. Il a également été rapporté que Bcl-2 peut être un régulateur de la production d'ERO mitochondriaux *via* son rôle sur le métabolisme oxydatif mitochondrial (Chen & Pervaiz, 2007 ; 2010). Cela ne semble pas être un effet direct, de type antioxydant, exercé par Bcl-2, mais plutôt un effet indirect par induction en *feedback* d'une réponse cellulaire adaptative (Chong *et al.*, 2014).

En accord avec la théorie pro-oxydante de la carcinogénèse évoquée précédemment, il a été proposé que Bcl-2 peut agir, dans certaines conditions, comme molécule pro-oxidante, favorisant son interaction avec le complexe GTPase-Rac1 au niveau de la mitochondrie ou la sous-unité Va de la cytochrome c oxydase (COX) (Veilathan *et al.*, 2011), ou bien anti-oxydante en réduisant la production mitochondriale de ROS dans les cellules en conditions de stress oxydant. Dans ce cas, Bcl-2 agit en diminuant son interaction avec la sous-unité Va de la COX et en interagissant avec le GSH pour diminuer l'excès de production d'ERO par la mitochondrie (Zimmermann *et al.*, 2007). Ce rôle joué par Bcl-2 dans le métabolisme et la

compartimentation intracellulaire du glutathion réduit (GSH) a été rapporté par quelques auteurs (Zimmermann *et al.*, 2007 ; Wilkins *et al.*, 2012). Ces observations font suite à des travaux plus anciens qui avaient montré d'une part, que la surexpression de Bcl-2 pouvait s'accompagner d'une augmentation du contenu cellulaire en GSH (Ellerby *et al.*, 1996) et d'autre part qu'on obtient une diminution du contenu en GSH et de l'activité glutathion peroxydase dans du tissu cérébral de souris KO pour Bcl-2 (Voehringer & Meyn, 2000). Plus récemment, Wilkins (2012) a montré, grâce à l'utilisation du BH3-mimétique HA14-1 dans des cultures primaires de neurones, que la relation entre Bcl-2 et le pool mitochondrial de GSH se fait par l'intermédiaire d'une interaction de Bcl-2 avec le transporteur mitochondrial de 2-oxoglutarate (2-OGC), ce dernier agissant en coordination avec Bcl-2 pour approvisionner la mitochondrie en GSH, dont la synthèse a lieu dans le cytosol. Dans notre travail, nous n'avons pas vu de variation du pool de GSH intra-mitochondrial dans notre modèle cellulaire, après traitement par l'ABT-737, ce qui laisse à penser que ce type d'interaction entre Bcl-2 et 2-OGC n'existe pas dans les cellules cancéreuses ou bien qu'une régulation plus complexe par d'autres membres de la famille Bcl-2 modifie cette interaction.

Il semble donc que le traitement combiné ABT-737/irradiation déclenche une modification de l'équilibre redox intra-mitochondrial qui s'effectue en plusieurs étapes et qui aboutit à la mort cellulaire. Une meilleure connaissance de ces étapes passe par la mesure des différentes enzymes impliquées dans les défenses anti-oxydantes mitochondriales dans ces conditions de stress. De plus, une étude complexe des conséquences de ce stress en termes d'oxydation des protéines (détermination de la proportion de protéines carbonylées ou nitrosylées), des lipides (par le dosage de produits de dégradation des lipides comme le 4-hydroxynonanal ou le malondialdéhyde) ainsi que leurs conséquences sur le fonctionnement des différents complexes de la chaîne respiratoire serait très informative.

6.3. Effet du traitement combiné sur la production de céramide

Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire sur différentes lignées cellulaires, dont des lignées issues de cancers des VADS, ont démontré que l'irradiation pouvait, dans certaines conditions expérimentales, déclencher une apoptose dépendante du céramide, un sphingolipide impliqué dans la signalisation apoptotique (Rodriguez-Lafrasse *et al.*, 2002 ; Alphonse *et al.*, 2002 ; Ardail *et al.*, 2009 ; Alphonse *et al.*, 2013). De plus, il a été démontré que cette voie céramide-dépendante, qui est inhibée dans la lignée radorésistante SQ20B, est potentiellement activable (Alphonse *et al.*, 2004). Il a également été montré que des modifications de

l'expression de la protéine Bcl-2 peuvent moduler l'apoptose *via* le métabolisme des sphingolipides (pour revue, Zhang & Saghatelian, 2013). Il en est de même pour Bax et Bak (von Haefen *et al.*, 2002 ; Siskind *et al.*, 2010) mais pas pour Bcl-X_L (Wiesner *et al.*, 1996). Dans ce contexte, nous avons voulu vérifier si l'association ABT-737/irradiation permettait de restaurer cette voie céramide-dépendante dans la lignée radiorésistante SQ20B. Cette hypothèse s'appuie de surcroît sur un travail récent (Siskind *et al.*, 2010) qui a montré que la protéine Bak joue un rôle fondamental dans le métabolisme des céramides à longue chaîne, pro-apoptotiques. L'expression de Bak étant augmentée suite au double traitement ABT-737/irradiation (voir partie suivante, Figure 53), la génération de céramide pourrait être impliquée dans la mort apoptotique des cellules déclenchée par ce traitement. Après extraction des différentes classes de sphingolipides, leur analyse et leur quantification ont été réalisées par HPLC couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS). Un exemple représentatif de séparation des différentes classes de céramides obtenue après HPLC-MS/MS est illustré dans la Figure 48.

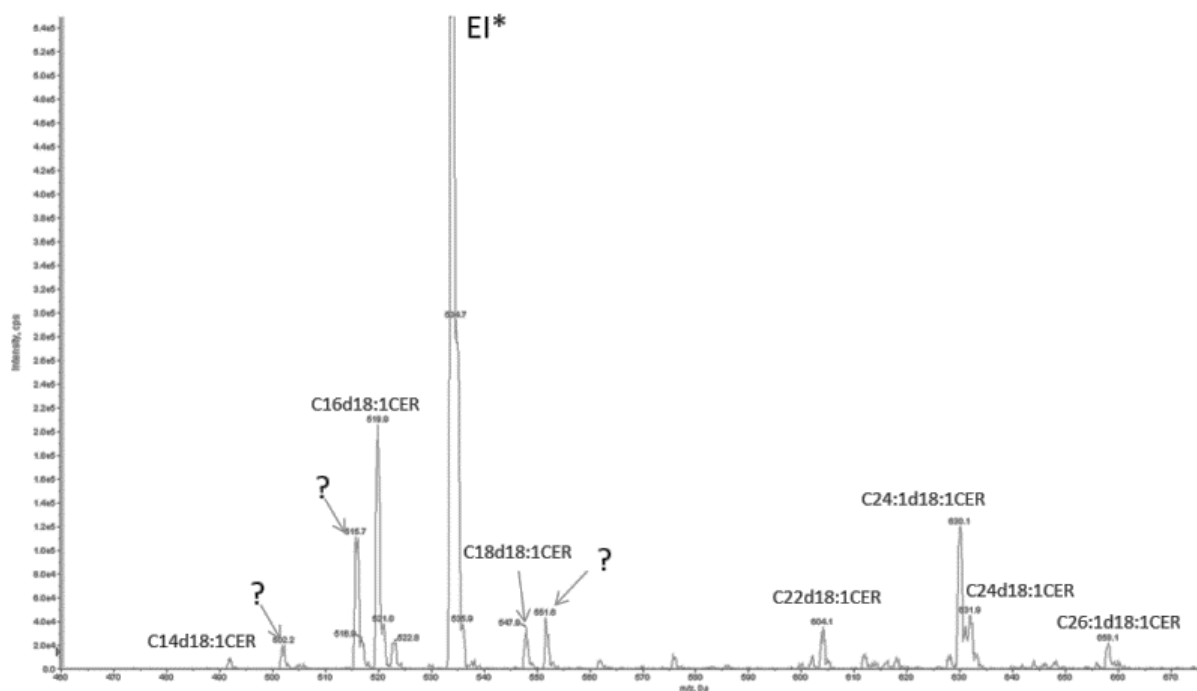


Figure 48 : Exemple de spectres obtenus lors de la séparation des céramides par HPLC-MS/MS.

Les résultats présentés dans ce travail ne tiennent compte que des espèces moléculaires majoritaires. On constate tout d'abord que les espèces moléculaires quantitativement

majoritaires dans la lignée SQ20B témoin (à 24 heures à titre d'exemple) sont des céramides en C16 et C24:1, puis à un degré moindre en C18, C22, C24 et C26:1 (Figure 49). Dans nos conditions expérimentales, nous avons limité notre étude comparative aux espèces moléculaires les importantes quantitativement (comprises entre 0,10 et 5 μ moles/g de protéines). Comme le montre les Figures 50, 51 et 52, il n'y a pas de variation quantitative significative des espèces moléculaires jusqu'à 72 heures après traitement et/ou irradiation. On commence à observer des différences pour le temps 120 heures. Ces modifications quantitatives ne touchent qu'un nombre limité d'espèces : il s'agit des espèces en C16, C18, C22, C16:1, C24:2, C18:1-OH et C22:1OH. L'irradiation seule provoque une augmentation des espèces saturées en C16, C18 et C22. Le traitement à l'ABT-737 seul exerce un effet, moins marqué, sur la production des espèces en C18, C22, C16:1 et C24:2. Le traitement combiné a pour effet d'augmenter la production de toutes les espèces moléculaires de céramides à 120 heures. L'ABT-737 potentialise l'effet de l'irradiation, cet effet étant le plus marqué pour les espèces en C16:1, C18 et C24:2.

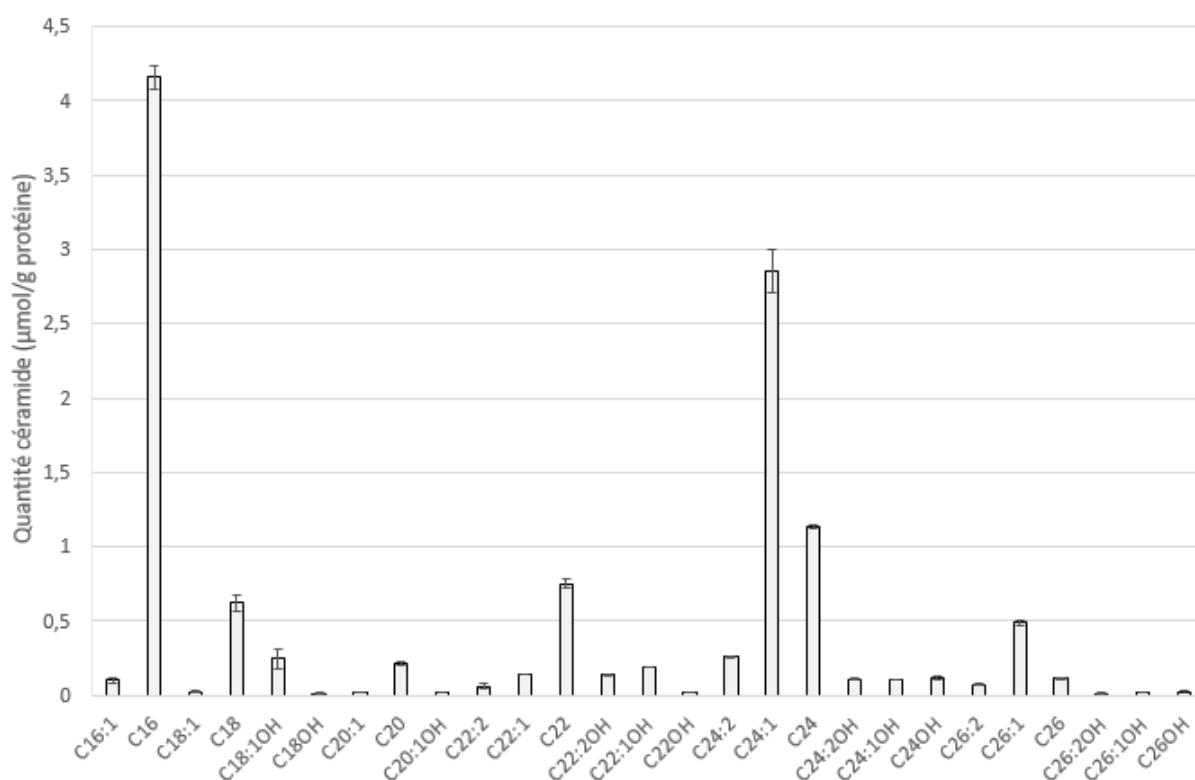


Figure 49 : Différents types de céramides présents dans les SQ20B témoin.

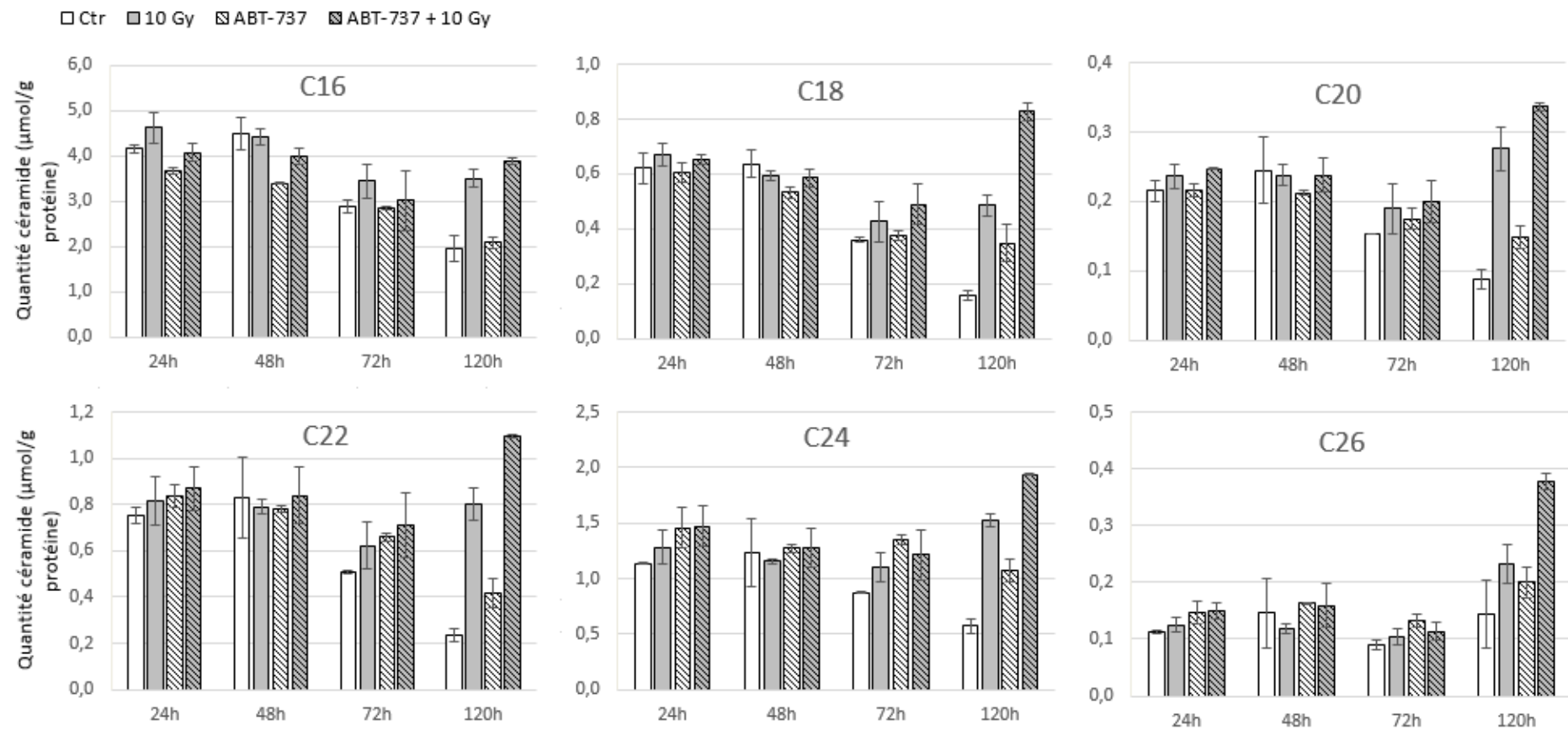


Figure 50 : Evolution de la quantité des espèces saturées de céramide lors des traitements de la lignée SQ20B.

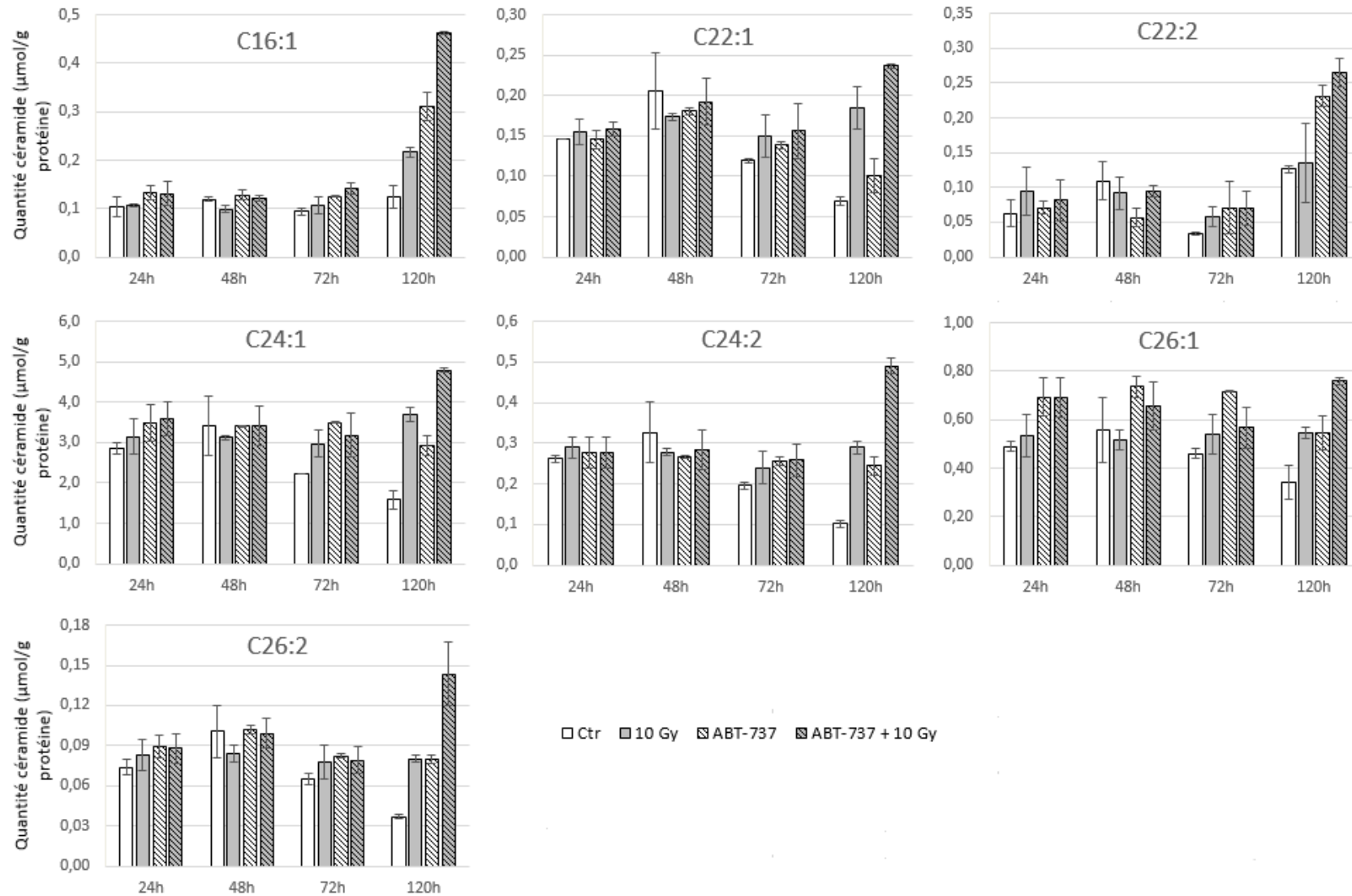


Figure 51 : Evolution de la quantité des espèces insaturées de céramide lors des traitements de la lignée SQ20B.

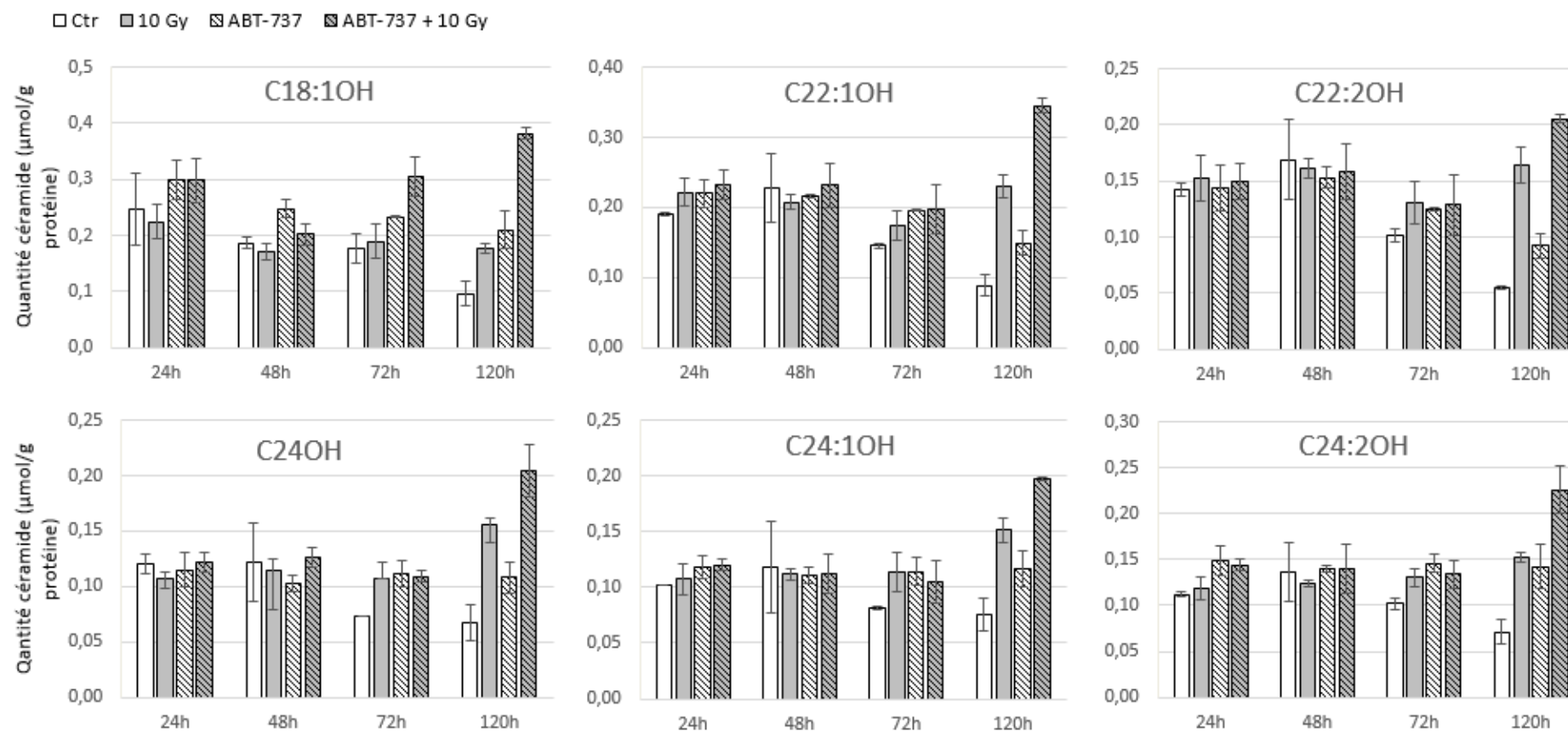


Figure 52 : Evolution de la quantité des espèces hydroxylées de céramide lors des traitements de la lignée SQ20B.

L'ensemble de ces résultats montre que l'ABT-737 associé à l'irradiation provoque une augmentation de la production de certaines espèces moléculaires de céramides, la contribution du traitement par l'ABT-737 étant plus modeste par rapport à l'irradiation pour les espèces moléculaires les plus abondantes. Compte-tenu de nos connaissances actuelles concernant les céramide-synthases et leurs spécificités vis-à-vis de leur substrat acyl-CoA (Mullen *et al.*, 2012), il semble que le traitement combiné stimule préférentiellement les céramide-synthases (CerS) 1 (spécifique du C18), 2 (spécifique des C22 et 24) et 5/6 (spécifique du C16).

Les données concernant la composition en céramides de lignées ou tumeurs des cancers des VADS sont peu nombreuses. On peut cependant citer les travaux de Koybasi *et al.* (2004) qui ont comparé les différentes espèces moléculaires de céramides extraites à partir de 32 tumeurs de cancers des VADS. Leurs résultats montrent une prédominance des espèces en C16 et C24:1 dans ces tumeurs, ce qui est conforme aux résultats que nous avons obtenus sur la lignée SQ20B. En revanche, aucune donnée n'est actuellement disponible dans la littérature concernant l'effet de l'ABT-737 ou d'autres BH3-mimétiques sur la synthèse de céramides ou bien son inhibition, qu'il soit utilisé seul ou en association avec d'autres molécules chimio-thérapeutiques. Concernant les cancers des VADS, notre laboratoire a démontré récemment que l'irradiation (en photons ou en carbone) déclenche une production tardive (120 heures après irradiation) de céramides totaux dans les lignées radio-résistantes comme SQ20B. Cette production est corrélée avec la mort apoptotique tardive de ces mêmes cellules (Alphonse *et al.*, 2013). Notre travail confirme que l'irradiation, associée ou non à un pré-traitement par l'ABT-737, active la synthèse tardive de céramides, tout particulièrement les produits des CerS1 (C18), CerS2 (C22 et 24) et CerS5 (C16).

Les relations entre l'activation de certaines céramide-synthases et le déclenchement ou la protection contre l'apoptose dans les cancers des VADS sont complexes et donnent des résultats qui peuvent sembler contradictoires. En effet, Senkal *et al.* (2010) ont montré que les CerS1 et CerS6 pouvaient jouer des rôles opposés, pro-apoptotique pour l'une et pro-survie pour l'autre dans des lignées des cancers des VADS. Ce rôle en faveur de la survie joué par la CerS6 est inattendu. L'augmentation de C16 céramide, pro-apoptotique, obtenu dans notre travail après irradiation peut s'expliquer par le fait que le céramide en C16 produit dans la lignée SQ20B provient probablement de l'activation préférentielle de la CerS5 plutôt que la CerS6, les deux enzymes étant

capables d'utiliser le même substrat, un acyl-CoA en C16, pour former du céramide (Mullen *et al.*, 2012). Pour aller plus en amont dans la connaissance de ces relations entre irradiation, ceramide-synthases et apoptose, de futures expériences d'inhibition de l'expression des ceramide-synthases potentiellement impliquées par siRNA devront être réalisées.

6.4. Modification de l'expression des protéines de la famille Bcl-2 après traitement et/ou irradiation

Etant donné que la translocation de Bax à la mitochondrie ne semble pas être suffisante pour induire massivement l'apoptose, nous nous sommes intéressés à la modification de l'expression des protéines BH3-only « senseurs », PUMA et Noxa, qui pourrait être modifiée par l'irradiation (Figure 53 ; Tableau 13). Nous observons effectivement une augmentation de l'expression de **Noxa** après irradiation, expression qui est accentuée lors du double traitement (+105% après 10 Gy, +59% après traitement par l'ABT-737 et +188% après traitement et irradiation).

Parallèlement, l'expression de **PUMA** n'est pas modifiée après l'irradiation, mais diminuée de moitié après traitement par l'ABT-737. Cette diminution d'expression semble moins importante après le double traitement. PUMA ayant un profil d'affinité proche de l'ABT-737, la diminution d'expression suite au traitement peut être dû à une boucle de régulation négative sur PUMA lorsque les protéines anti-apoptotiques sont saturées en BH3 mimétique.

De plus, bien que nous ayons déjà observé une translocation de Bax à la mitochondrie, nous avons également quantifié l'expression des protéines pro-apoptotiques effectrices Bax et Bak à l'échelle de la cellule entière (Figure 53 ; Tableau 13). Nous observons une augmentation de l'expression de **Bak** (+110% et +96%) par rapport au témoin, avec et sans irradiation, alors que l'irradiation seule ne modifie pas son expression. L'expression de **Bax**, quant à elle, ne change pas de façon significative et ce quelles que soient les conditions expérimentales.

Enfin, nous avons également vérifié l'expression des **protéines anti-apoptotiques** de la famille Bcl-2 (Figure 53 ; Tableau 13). L'expression de Mcl-1 ne change pas après irradiation mais augmente légèrement après traitement par l'ABT-737 (+44%) et un peu plus après traitement et irradiation (+76%). Le même type de réponse est observé pour Bcl-2, avec une

augmentation de l'expression de 31% après traitement par l'ABT-737 seul. Enfin, l'expression de Bcl-X_L est augmentée après irradiation seule (+58%) ou associée à l'ABT (+80%), mais n'est pas modifiée après traitement par l'ABT-737 seul.

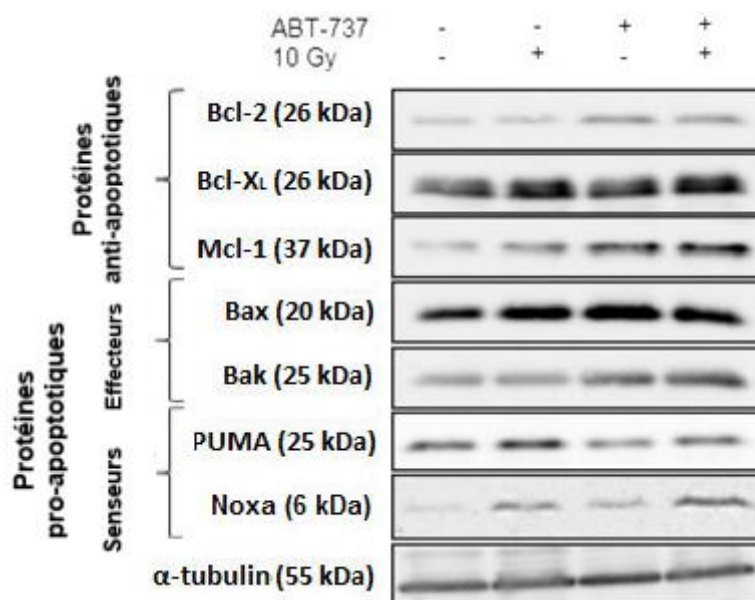


Figure 53 : Expression des protéines de la famille Bcl-2 24 heures après traitement et/ou irradiation dans les SQ20B.

	10 Gy	ABT-737	ABT-737 10 Gy
<i>Bcl-2</i>	0%	+31%	+9%
<i>Bcl-X_L</i>	+58%	+26%	+80%
<i>Mcl-1</i>	+4%	+44%	+76%
<i>Bax</i>	+3%	+12%	+8%
<i>Bak</i>	+2%	+110%	+96%
<i>PUMA</i>	+9%	-43%	-15%
<i>Noxa</i>	+105%	+59%	+188%

Tableau 13 : Expression des protéines de la famille Bcl-2 normalisé par l'expression de l' α -tubuline par rapport au control.

En résumé, si l'on considère les effets notables de l'irradiation : elle induit la translocation de Bax à la mitochondrie mais sans augmenter son expression. En revanche, elle augmente l'expression de la protéine Noxa, protéine qui est très faiblement exprimée

au niveau basal et à un moindre degré Bcl-X_L qui est déjà élevée au niveau basal. Parallèlement, l'irradiation n'induit pas de changement d'expression de PUMA.

L'ABT-737 seul augmente modérément l'expression de Noxa et surtout celle de Bak. Les autres protéines sont également modulées positivement, de façon plus ou moins marquée, à l'exception de PUMA pour laquelle on observe une légère modulation négative.

En associant ABT-737 et irradiation, l'effet le plus marqué concerne leur effet cumulatif sur l'expression de Noxa. Il a été montré dans d'autres études que l'augmentation de l'expression de Noxa permet de cibler la dégradation de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 au protéasome (Bertin-Ciftci *et al.*, 2013 ; van Delft *et al.*, 2006 ; Okumura *et al.*, 2008 ; Zall *et al.*, 2010). Cependant, dans notre cas, cette augmentation d'expression n'est pas corrélée avec une diminution de l'expression de Mcl-1. Cette observation a déjà été faite dans le cancer du poumon, dans lequel l'augmentation de Noxa permet d'inhiber Mcl-1 sans favoriser sa dégradation, mais permet tout de même la libération des protéines pro-apoptotiques effectrices Bax et Bak (Hauck *et al.*, 2009). Enfin, le traitement par l'ABT-737 augmente également l'expression de Bak, sans que l'irradiation potentialise cet effet.

Hormis la forte augmentation de l'expression de Noxa après irradiation, augmentation potentialisée par l'ABT-737, ces résultats sont dans l'ensemble difficiles à interpréter si l'on s'en tient au rôle respectif de chacune de ces protéines, prise isolément, dans la régulation de l'apoptose.

La modulation de l'expression des protéines de la famille Bcl-2 en réponse aux différents stress est un phénomène particulièrement complexe qui varie en fonction de la nature du stress considéré, du type de cancer et de la radiosensibilité intrinsèque des cellules ou des individus. En effet, il a été rapporté par exemple que l'irradiation s'accompagne *in vitro* d'une augmentation de l'expression de Bcl-2 dans une lignée de cellules leucémiques (Karyia *et al.*, 1999) alors qu'elle est non modifiée dans une autre (Strasser-Wozak *et al.*, 1998). Dans ces deux lignées, l'expression de Bax est inchangée. *In vivo*, des études rétrospectives réalisées sur des biopsies soulignent de façon encore plus marquée cette hétérogénéité d'expression des protéines de la famille Bcl-2 après irradiation. Ainsi, Adhya *et al.* (2006) ont montré une augmentation de Bax et une

diminution de Bcl-X_L dans des biopsies de patients atteints de carcinomes du col de l'utérus alors que Bcl-2 n'est pas modifié après irradiation. Des résultats similaires ont été rapportés dans le même type de cancer par Kokawa *et al.* (1999). Dans le cancer rectal, c'est une augmentation de Mcl-1 qui a été rapportée après radiothérapie néoadjuvante (Ulrich-Pur *et al.*, 2005). Enfin, dans une étude concernant le cancer de la prostate après radiothérapie, une augmentation de Bcl-2 a été observée chez 16% des patients, de Bax chez 23% et de Bcl-X_L chez 53% d'entre eux (Pollack *et al.*, 2003).

De même, l'expression des protéines de la famille Bcl-2 peut être modulée de façon très variable dans divers types de cancers après traitement des cellules par l'ABT-737. Ainsi l'ABT-737 seul peut induire l'expression de Bim dans des cellules Hela (Wang *et al.*, 2012), celle de Noxa dans le cancer colorectal (Raats *et al.*, 2011), celle de Mcl-1 dans des lignées de cancer du foie, du pancréas et du colon (Bhat *et al.*, 2010) ou celle de Bad et à un degré moindre Bim dans le cancer du foie ou du pancréas (Ezzoukhry *et al.*, 2011). A contrario, l'ABT-737 peut également réprimer l'expression de Bcl-2 et de Bcl-X_L dans le cancer du sein (Li *et al.*, 2012).

L'ABT-737 permet d'augmenter la sensibilité à d'autres drogues chimiothérapeutiques et inversement. Ces sensibilisations impliquent le plus souvent des modifications de l'expression de protéines de la famille Bcl-2. A titre d'exemples, une diminution de l'expression de Mcl-1 permet d'augmenter la sensibilité à l'ABT-737 dans le rétinoblastome (Allaman-Pillet *et al.*, 2013), le lymphome à cellules du manteau (Touzeau *et al.*, 2011), le gliome (Tagsherer *et al.*, 2008), ou encore le cancer de l'ovaire (Simonin *et al.*, 2013). Concernant les autres protéines de la famille Bcl-2, la vinblastine, provoque une augmentation de l'expression de Noxa dans la leucémie lymphoïde chronique (Bates *et al.*, 2013) et ainsi sa sensibilité à l'ABT-737. C'est le cas également dans le gliome en présence d'un inhibiteur de dé-acétylation des histones (Foster *et al.*, 2014). Lorsque l'ABT-737 est associé à l'irradiation, leur action synergique se traduit par une augmentation de l'expression de Bim dans les cellules Hela (Wang *et al.*, 2012b). ABT-737 et irradiation peuvent également avoir des effets antagonistes : l'ABT-737 augmente l'expression de Mcl-1 alors que l'irradiation la diminue dans le cancer du sein (Wu *et al.*, 2014).

Tous ces exemples montrent combien la réponse à l'ABT-737, seul, associé à d'autres drogues ou à l'irradiation, est hétérogène en termes d'expression des différentes

protéines de la famille Bcl-2. Compte-tenu de l'interactome complexe liant ces protéines, nos résultats confirment qu'il est difficile d'apprécier le rôle joué par chacune d'entre elles dans l'effet synergique global obtenu avec l'ABT-737 et l'irradiation dans notre modèle cellulaire.

6.5. Transfection par un siRNA anti-Noxa

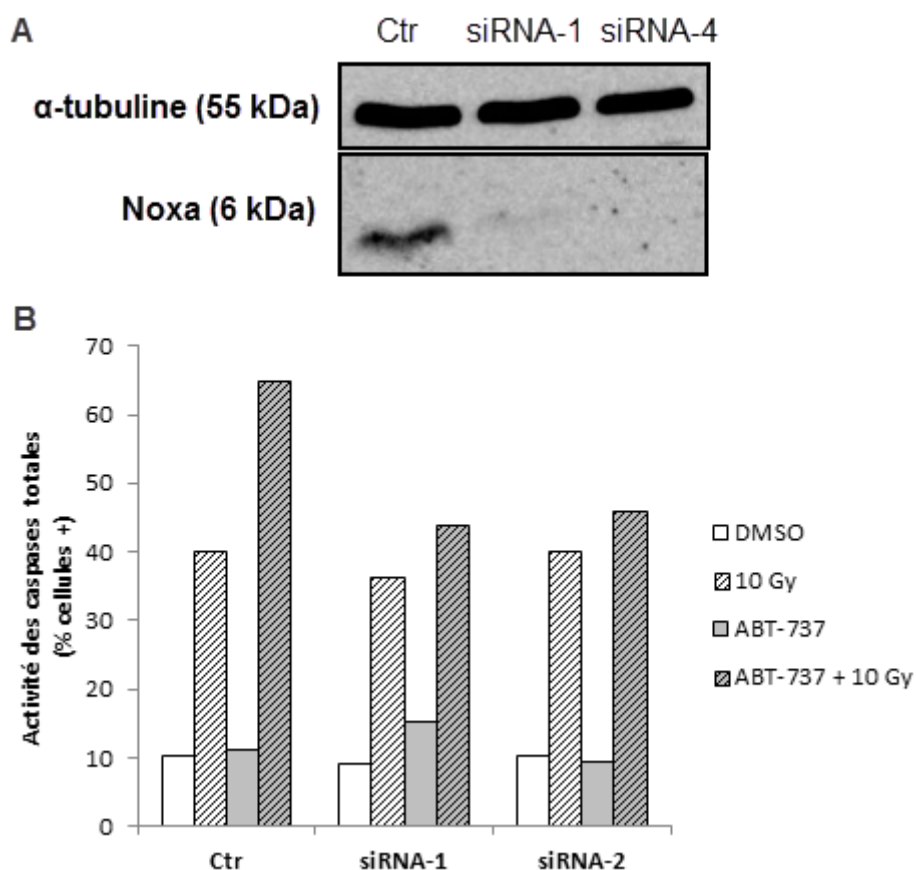


Figure 54 : Effet de l'extinction de Noxa dans les cellules SQ20B avant traitement par l'ABT-737 et/ou irradiation.

A. Contrôle de l'extinction de la protéine Noxa avant le traitement et/ou l'irradiation. **B.** Activité des caspases totales après transfection au temps 120 heures.

Dans le but de déterminer le rôle potentiel de la protéine Noxa dans la radiosensibilisation de la lignée cellulaire SQ20B par l'ABT-737, nous avons transfecté la lignée parentale par des siRNAs dirigés contre Noxa, à savoir un siRNA contrôle (Ctr), un siRNA-1 dirigé contre la région 3' de l'ARNm de Noxa et un siRNA-4 dirigé contre la région

5' de l'ARNm de Noxa. L'extinction de l'expression de la protéine a été contrôlée et validée par Western blot comme le montre la Figure 54.A.

A la suite de cette transfection, les cellules sont traitées et/ou irradiées puis récupérées au temps 120h dans le but d'évaluer la proportion de cellules en apoptose, ceci par quantification en cytométrie de flux des cellules ayant des caspases actives (Figure 54.B.). Il faut souligner que ces résultats sont préliminaires et n'ont été réalisés qu'une seule fois.

Au niveau du siRNA contrôle, les résultats obtenus sont en accord avec ceux obtenus précédemment en absence de transfection (Figure 43.B.), avec une faible proportion de cellules positives aux caspases totales lors du traitement par l'ABT-737 seul et une augmentation lors du double traitement de 65%. De plus, bien que l'expression de Noxa augmente lors de l'irradiation (Figure 53), l'extinction de Noxa dans cette condition n'annihile pas l'entrée des cellules en apoptose, quel que soit le siRNA utilisé. Ceci montre que l'augmentation de l'expression de Noxa après irradiation seule n'est pas responsable de la mort cellulaire programmée dans cette condition expérimentale. En revanche, après transfection par le siRNA anti-Noxa suivi du traitement combinant l'ABT-737 et l'irradiation, le pourcentage de cellules positives redescend à la même valeur que celle obtenue après irradiation seule. Ce résultat suggère que la forte augmentation de l'expression de Noxa obtenue après traitement et irradiation participe à l'augmentation du nombre de cellules entrant en apoptose.

7. Effet de l'ABT-737 combiné à l'irradiation sur la croissance tumorale *in vivo*

Les effets de l'ABT-737 combiné à l'irradiation étant bien démontrés *in vitro*, nous avons réalisé en parallèle une étude *in vivo*, afin de confirmer le potentiel thérapeutique de cette association. Des xénogreffes de cellules SQ20B ont été implantées dans des souris immunodéprimées réparties en quatre groupes : un groupe de souris contrôles (Ctr), un groupe de souris irradiées (10 Gy), un groupe de souris traitées par l'ABT-737 et enfin un groupe de souris ayant à la fois reçu le traitement par l'ABT-737 et l'irradiation (ABT-737/10 Gy). Concernant la pousse tumorale, la Figure 55 montre que les tumeurs des souris irradiées ont une croissance un peu plus lente que les souris Ctr la semaine après le traitement, mais qu'elles croissent à nouveau rapidement les semaines suivantes. Le traitement par l'ABT-737 seul a un effet similaire, mais sur une période un peu plus longue. Enfin, les tumeurs des souris ayant été traitées par l'ABT-737 et irradiées ont une croissance similaires aux tumeurs des souris ABT-737 jusqu'au jour 30, croissance qui ralentit après.

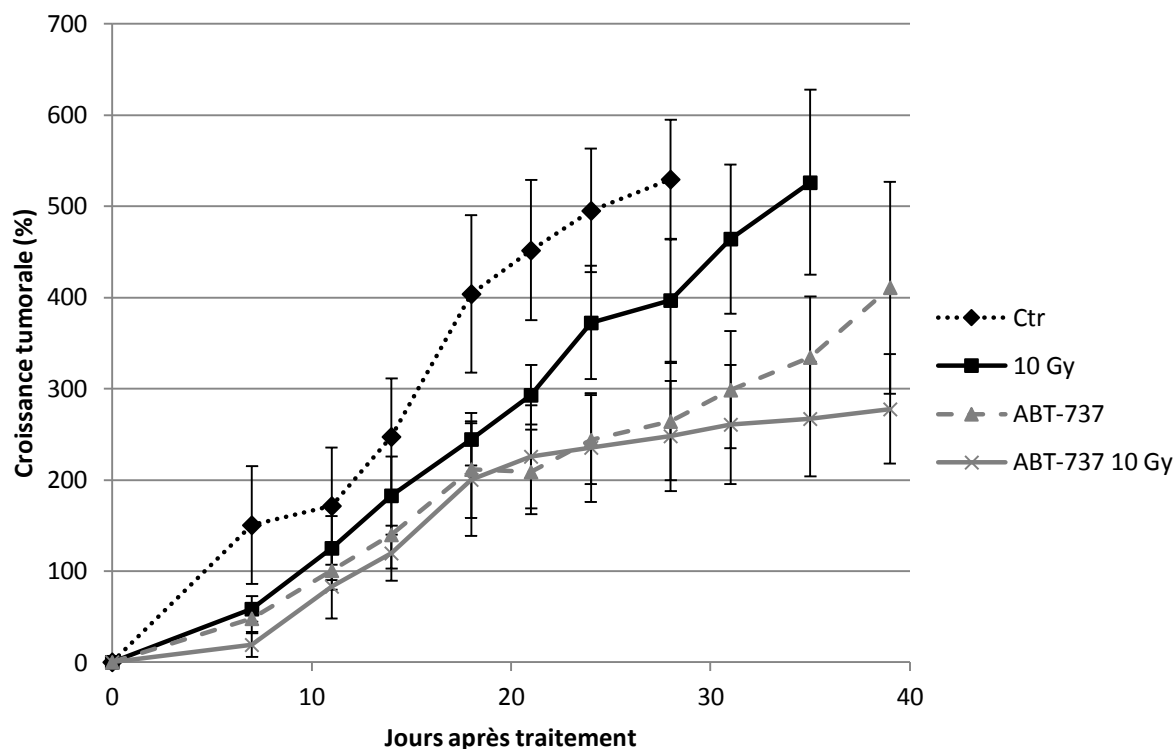


Figure 55 : Croissance tumorale des xénogreffes de SQ20B chez la souris.

Ces résultats montrent que l'irradiation et le traitement par l'ABT-737 permettent de ralentir la croissance tumorale pendant la semaine de traitement. Cependant, après irradiation les tumeurs retrouvent une croissance comparable avec les souris contrôles. Comparativement, les tumeurs traitées ont une croissance retardée. Enfin, les souris ayant subies un double traitement ont une croissance tumorale beaucoup plus faible, notamment 20 jours après traitement.

Ces résultats sont prometteurs pour d'éventuels essais cliniques ultérieurs. Cependant, une drogue administrable oralement et ayant des propriétés les plus proches de l'ABT-737 reste à être découverte. L'ABT-737 n'étant pas soluble dans l'eau, c'est une molécule difficile à manipuler en clinique. L'ABT-263, une autre molécule basée sur la même structure et étant disponible oralement, était entrée en étude clinique de phase II. Cependant les modifications apportées à cette molécule augmentent son affinité pour Bcl-X_L et induisait des thrombocytopénies réversibles, mais qui ont été jugées trop

dangereuses pour le patient. Cette molécule a donc été retirée des études et les Laboratoires Abott sont actuellement en recherche active pour améliorer ce profil d'affinité. Une nouvelle molécule appelée ABT-199 ayant des propriétés améliorées est apparue sur le marché, mais de façon trop tardive pour pouvoir être incluse dans notre étude.

L'utilisation de l'ABT-737, seul ou en association avec d'autres molécules, a fait l'objet d'un certain nombre d'études pré-cliniques *in vivo*. Concernant l'effet de l'ABT-737 utilisé seul, *in vivo*, les données de la littérature sont très restreintes et concernent essentiellement un travail récent sur le chondrosarcome (Morii *et al.*, 2014). L'immense majorité des travaux publiés concerne des effets synergiques exercés entre l'ABT-737 et d'autres molécules dans divers modèles de cancers. Parmi ceux-ci, on peut citer l'utilisation combinée de l'ABT-737 avec la rapamycine dans le cancer du poumon (Kim *et al.*, 2009c ; Gardner *et al.*, 2014), le 2-déoxyglucose dans le lymphome non Hodgkinien (Yamaguchi *et al.*, 2011), le carboplatine dans le cancer de l'ovaire (Witham *et al.*, 2007), la gemcitabine dans le cancer du poumon (Zhang *et al.*, 2011), le trioxyde d'arsenic dans le carcinome gastrique (Sun *et al.*, 2012), fenrétinide dans le neuroblastome (Fang *et al.*, 2011) et le mélanome (Mukerjee *et al.*, 2015) ou encore le bortézomide dans le mélanome (Reuland *et al.*, 2012). Les résultats *in vivo* concernant l'association entre l'ABT-737 et l'irradiation sont beaucoup plus restreints. En effet, la radio-sensibilisation induite par l'ABT-737 *in vivo* n'a pour l'instant été décrite que dans le cancer du poumon non à petites cellules (Kim *et al.*, 2009) et dans le cancer du sein (Li *et al.*, 2012). Concernant les cancers des VADS, aucune donnée sur des essais *in vivo* utilisant l'ABT-737 n'a été publiée jusqu'à présent, que ce soit en association avec d'autres molécules chimio-thérapeutiques ou bien avec l'irradiation. Ceci est surprenant, compte-tenu des effets synergiques obtenus *in vitro* entre l'ABT-737 et de nombreuses autres molécules utilisées en chimiothérapie anticancéreuse. Nos résultats, bien que préliminaires, sont en ce sens encourageants et méritent d'être poursuivis.

Partie 2. Etude d'une sous-population de cellules souches cancéreuses issue de la lignée SQ20B

1. Etude de différents marqueurs de cellules souches cancéreuses

1.1. Comparaison de deux populations ayant des marqueurs souches différents

Une étude réalisée au laboratoire a montré qu'il est possible d'isoler des cellules possédant des caractéristiques de cellules souches cancéreuses (CSC) à partir de la lignée cellulaire SQ20B (Bertrand *et al.*, 2014). Le tri de cette sous-population est réalisé en deux étapes : un premier tri permet de sélectionner une sous-population (SP : *Side Population*) sur-exprimant des transporteurs membranaires comme ABCG2 et donc capable d'exclure un colorant vital tel que le Hoechst 433342, puis un deuxième tri qui permet de sélectionner les cellules exprimant CD44, une glycoprotéine de la surface cellulaire impliquée dans l'adhésion cellulaire et la migration (Kim *et al.*, 2004b ; Kajita *et al.*, 2001) et l'aldéhyde déshydrogénase 1, une enzyme cytosolique catalysant l'oxydation d'aldéhydes toxiques en acides carboxyliques (Yoshida *et al.*, 1992). Ces deux marqueurs ont été identifiés et reconnus comme marqueurs des CSC dans les cancers des VADS (Sayed *et al.*, 2011 ; pour revue, Major *et al.*, 2013). La sous-population ALDH^{high}/CD44^{high}, issue du deuxième tri cellulaire est quantitativement très réduite. Afin d'améliorer, d'une part, le rendement du tri des CSC et de vérifier, d'autre part, la pertinence de l'utilisation systématique de ces deux marqueurs de CSC, nous avons réalisé plusieurs tests en comparant respectivement les populations ALDH^{high}/CD44^{high} et ALDH^{low}/CD44^{high}, cette dernière étant quantitativement beaucoup plus importante dans la *Side Population*.

Nous avons, dans un premier temps, suivi l'évolution de l'expression de ces marqueurs ALDH^{high}/CD44^{high} après les différents passages des cellules en culture. De façon surprenante, l'expression de l'ALDH n'est pas conservée, et ce dès le premier passage des cellules (Figure 56.B.). En effet, nous observons une diminution de cellules doublement positives à 4,7%, alors qu'il y a toujours 94,9% de cellules ALDH^{low}/CD44^{high} et 0,3% de cellules ALDH^{high}/CD44^{low}.

D'autre part, après le tri des cellules $ALDH^{low}/CD44^{high}$, l'expression du CD44 reste forte avec 99,3% de cellules positives (Figure 56.C.).

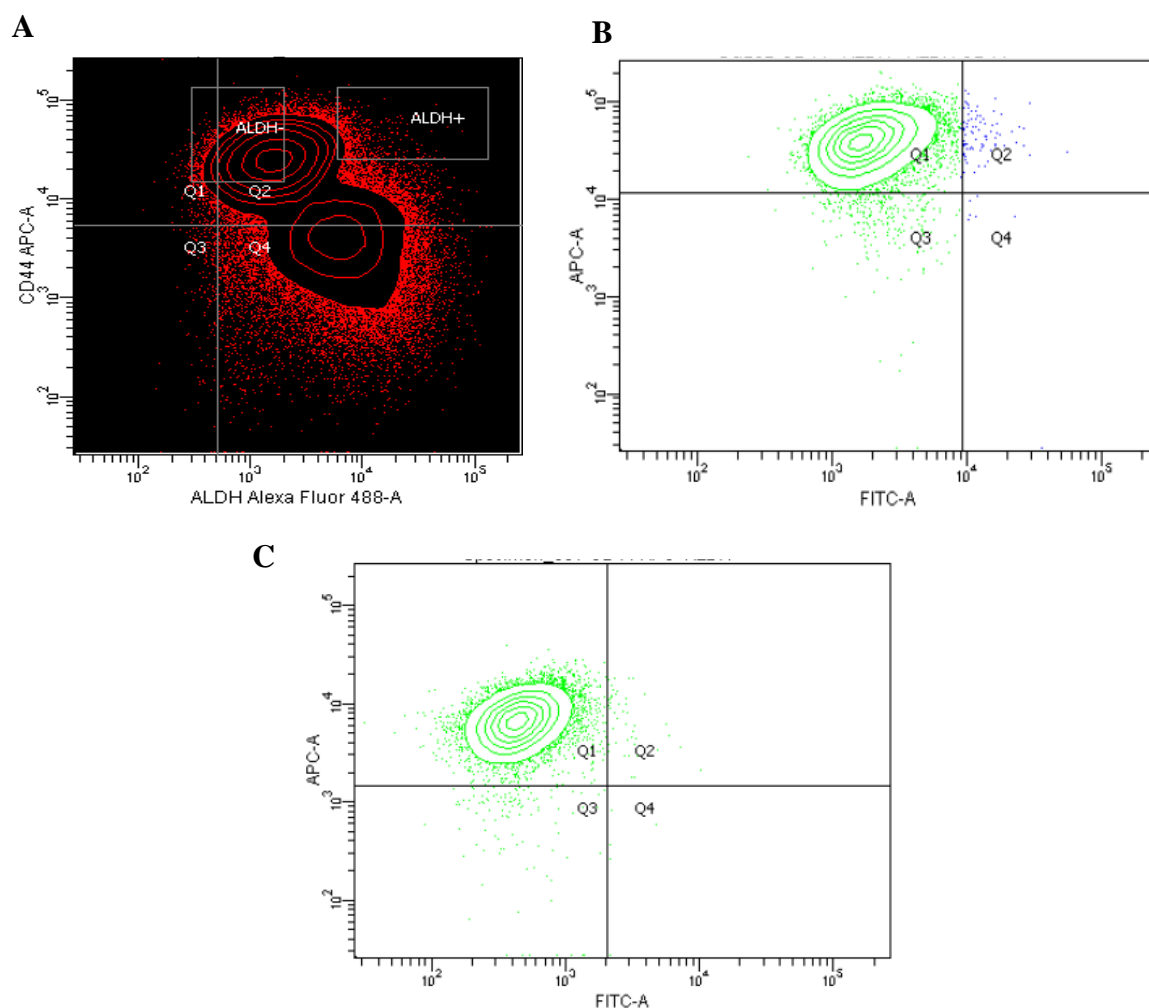


Figure 56 : Marquage des cellules $ALDH^{high}/CD44^{high}$ et $ALDH^{low}/CD44^{high}$.

A. Double marquage des cellules lors du tri cellulaire ; la population à gauche correspond aux cellules $ALDH^{low}/CD44^{high}$ et celle de droite aux cellules $ALDH^{high}/CD44^{high}$. **B.** Double marquage des cellules $ALDH^{high}/CD44^{high}$ après 1 passage. **C.** Double marquage des cellules $ALDH^{low}/CD44^{high}$ après 1 passage.

Ces premières observations nous ont interpellé sur la pertinence de l'utilisation systématique de l'ALDH comme marqueur des CSC dans cette lignée cellulaire et nous nous sommes demandés si les cellules triées présentant le phénotype initial $ALDH^{high}/CD44^{high}$ mais qui ont perdu rapidement le caractère ALDH présentent toujours des caractéristiques de CSC. Pour cela, nous avons cultivé les deux sous-populations issues du tri initial dans des conditions

de formation de tumorisphères (flasques *low-binding*, héparine). Les cellules souches sont capables de former des colonies même lorsqu'elles ne sont pas collées à un support mais en présence d'un minimum de facteurs de croissance. Dans notre cas, nous observons que ces deux sous-populations ($\text{ALDH}^{\text{high}}/\text{CD44}^{\text{high}}$ et $\text{ALDH}^{\text{low}}/\text{CD44}^{\text{high}}$) sont capables de former des tumorisphères (Figure 57). Ceci démontre que, dans notre modèle cellulaire, les cellules $\text{CD44}^{\text{high}}$ ont des caractéristiques de cellules souches, quel que soit leur statut ALDH.

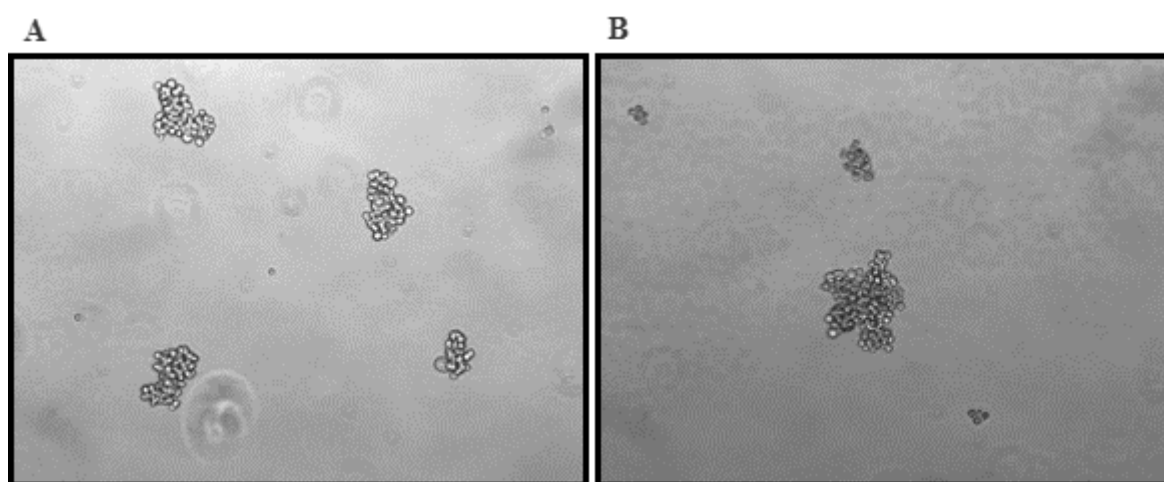


Figure 57 : Formation de tumorisphères.

A. Tumorisphères obtenues à partir de cellules $\text{ALDH}^{\text{low}}/\text{CD44}^{\text{high}}$. **B.** Tumorisphères obtenues à partir de cellules $\text{ALDH}^{\text{high}}/\text{CD44}^{\text{high}}$.

En résumé, les cellules triées $\text{ALDH}^{\text{high}}/\text{CD44}^{\text{high}}$ perdent rapidement le caractère $\text{ALDH}^{\text{high}}$, beaucoup plus lentement le caractère $\text{CD44}^{\text{high}}$. Les deux sous-populations triées sont en revanche capables de former des tumorisphères.

1.2. Etude de différents milieux de culture sur l'expression des marqueurs ALDH et CD44

Compte-tenu de la perte rapide du phénotype ALDH évoquée précédemment, nous avons cultivé les cellules dans des milieux de composition différentes afin de vérifier si la perte

de cette caractéristique ALDH était liée à la présence ou non de certains facteurs de croissance dans le milieu de culture ou bien simplement aux conditions de culture cellulaires utilisées. Deux milieux de culture ont donc été comparés immédiatement après tri cellulaire ainsi que pour les entretiens des cellules :

- le milieu 1 est le milieu qui est utilisé traditionnellement au laboratoire, contenant 5% de SVF et de l'EGF ;
- le milieu 2 contient moins de SVF (1%), susceptible de contenir des facteurs de différenciation mais est supplémenté en EGF et β -FGF. De plus, le milieu 2 est dépourvu d'hydrocortisone.

Des contrôles ont été ensuite réalisés à chaque passage afin d'évaluer la perte des marqueurs CD44 et ALDH. En ce qui concerne les cellules ALDH^{high}/CD44^{high}, la comparaison est réalisée sur deux tris différents en raison de la faible quantité de cellules récupérées au cours de chaque tri cellulaire. Nous observons que le changement de milieu (passage du milieu 1 au milieu 2) n'a aucune influence sur la perte du marquage ALDH mais qu'il accélère la perte du marquage CD44. En effet, la Figure 58 montre d'une part que le pourcentage de cellules doubles positives n'est pas meilleur avec le milieu 2 (0,2% avec le milieu 2 contre 0,4% avec le milieu 1), alors que le pourcentage de cellules CD44^{high} est plus faible (24% pour le milieu 2 contre 99,3% avec le milieu 1).

D'autre part, la comparaison des deux milieux de culture a également été effectuée sur les cellules ALDH^{low}/CD44^{high}. Cette comparaison a pu être réalisée sur un même tri en raison de la plus grande quantité de cellules récupérées. Les cellules ALDH^{low}/CD44^{high} se comportent sensiblement de la même façon, avec toutefois une différenciation accélérée après utilisation du milieu 2 : les cellules perdent le caractère CD44^{high} plus rapidement, avec une diminution de 91,7% de cellules CD44^{high} avec le milieu 1 à 74,7% de cellules CD44^{high} avec le milieu 2 dès le premier passage (Figure 59).

En résumé, la diminution du taux de SVF dans le milieu, qui contient très probablement des agents de différenciation et qui pourrait être à l'origine de la perte rapide du caractère ALDH^{high}, ne donne pas de meilleurs résultats, que ce soit sur la sous-population ALDH^{high}/CD44^{high} ou la sous-population ALDH^{low}/CD44^{high}.

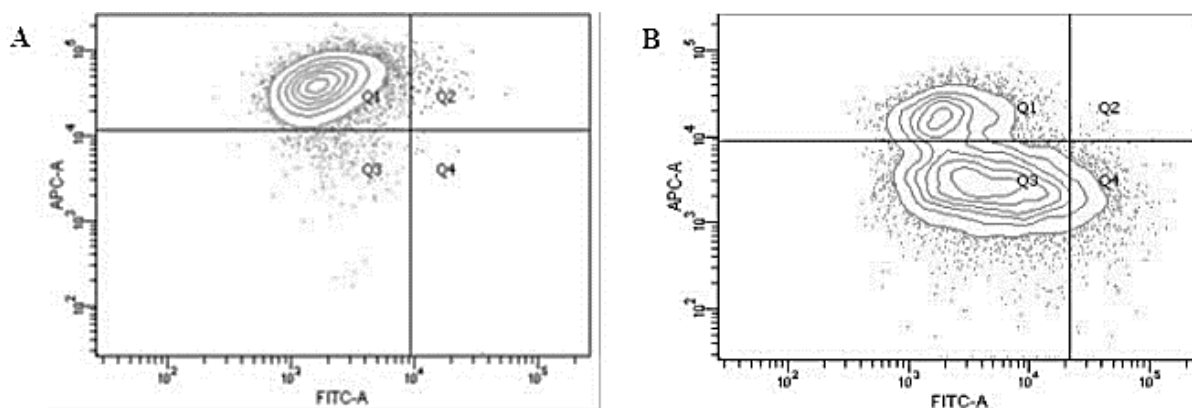


Figure 58 : Evolution de l'expression des marqueurs CD44 et ALDH dans les cellules ALDH^{high}/CD44^{high} lors de la culture dans deux milieux différents.

A. Marquage des cellules cultivées en milieu 1. **B.** Marquage des cellules cultivées en milieu 2.

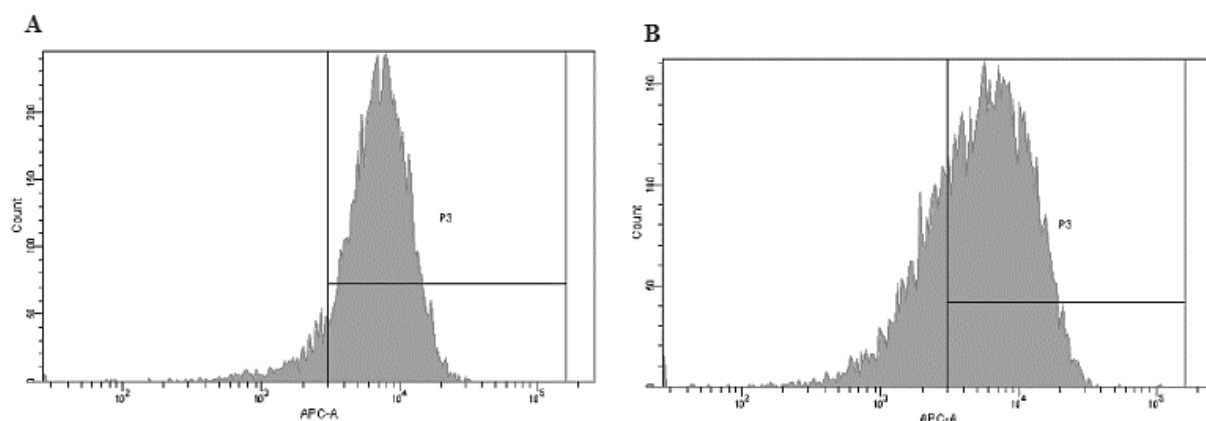


Figure 59 : Evolution de l'expression du marqueur CD44 dans les cellules ALDH^{low}/CD44^{high} lors de la culture dans deux milieux différents.

A. Marquage des cellules cultivées en milieu 1. **B.** Marquage des cellules cultivées en milieu 2.

1.3. Etude de la culture en tumorisphères sur l'expression de l'ALDH et du CD44

Il a été montré que la culture en tumorisphères permet d'enrichir des populations en cellules souches, notamment dans les cancers du sein (Patel & Rameshwar, 2013) ou dans les cellules neuronales (Pacey *et al.*, 2006). Lors de notre étude, nous nous sommes donc demandés si la culture en tumorisphères pouvait nous aider à conserver les caractères CD44 et/ou ALDH plus longtemps par rapport à des conditions de culture classiques. Dans ce but, après avoir

obtenu des tumorisphères à partir des différentes sous-populations, les cellules sont trypsinées et marquées afin de voir l'évolution de l'expression des marqueurs CD44 et ALDH.

Les cellules triées $ALDH^{high}/CD44^{high}$ ont étéensemencées en tumorisphères au premier passage, passage pour lequel on dénombrait seulement 0,2% de cellules $ALDH^{high}/CD44^{high}$ et 9,8% de $ALDH^{high}/CD44^{low}$. Après culture en tumorisphères, ces pourcentages montent à 2,3% pour les cellules $ALDH^{high}/CD44^{high}$ et 28,9% pour les cellules $ALDH^{high}/CD44^{low}$, alors qu'en culture classique, on retrouve 0,2% de cellules $ALDH^{high}/CD44^{high}$ et 2,3% de cellules $ALDH^{high}/CD44^{low}$ (Tableau 14). Il semble donc que la culture en tumorisphères des CSC issues de la lignée SQ20B permet d'enrichir la population initiale en cellules $ALDH^{high}$, mais pas en CD44 car les valeurs de cellules $ALDH^{low}/CD44^{high}$ ne changent pas après ce type de culture.

	Passage 1	Passage 2 tumorisphères	Passage 2
$ALDH^{high}/CD44^{high}$	0,2%	2,3%	0,2%
$ALDH^{low}/CD44^{high}$	23,9%	23,9%	14,2%
$ALDH^{high}/CD44^{low}$	9,8%	28,9%	2,3%

Tableau 14 : Culture des cellules $ALDH^{high}/CD44^{high}$ en tumorisphères après 1 passage en conditions classiques.

Proportion de cellules $ALDH^{high}/CD44^{high}$, $ALDH^{low}/CD44^{high}$ et $ALDH^{high}/CD44^{low}$ avant culture en tumorisphères (passage 1), après culture en tumorisphère (passage 2 tumorisphères) ou après culture standard (passage 2 standard).

Les mêmes types de résultats sont obtenus après culture en tumorisphères de la sous-population $ALDH^{low}/CD44^{high}$ (Tableau 15). En effet, nous observons une augmentation de la proportion de cellules $ALDH^{high}$ avec une augmentation de 0,2 % à 21,0 % de cellules $ALDH^{high}/CD44^{high}$. Dans ce cas, il n'y a pas de perte importante du marqueur CD44.

Au terme de cette étude, nous pouvons conclure qu'il est préférable de cultiver les cellules en tumorisphères si nous souhaitons garder le plus longtemps possible la caractéristique ALDH. Cependant, ce type de culture demande 10 jours d'ensemencement pour obtenir *in fine* une faible quantité de cellules, deux inconvénients potentiellement incompatibles avec certaines expériences qui nécessitent un nombre de cellules très important.

	Passage 1	Passage 2 tumorisphères	Passage 2
<i>ALDH^{high}/CD44^{high}</i>	0,2 %	21,0 %	0,2 %
<i>ALDH^{low}/CD44^{high}</i>	99,3 %	71,2 %	92,0 %
<i>ALDH^{high}/CD44^{low}</i>	0,0 %	2,8 %	0,0 %

Tableau 15 : Culture des cellules $ALDH^{low}/CD44^{high}$ en tumorisphères après 1 passage en conditions classiques.

Proportion de cellules $ALDH^{high}/CD44^{high}$, $ALDH^{low}/CD44^{high}$ et $ALDH^{high}/CD44^{low}$ avant culture en tumorisphères (passage 1), après culture en tumorisphère (passage 2 tumorisphères) ou après culture standard (passage 2 standard).

Ce test de culture en tumorisphères nous permet de maintenir le marqueur CD44 tout en augmentant légèrement l'ALDH. Cependant, au vue de l'hétérogénéité de la population obtenue et du rendement plus faible lors de ce type de culture, nous avons décidé de continuer à cultiver les cellules d'après un protocole classique.

Cette étude préliminaire sur les conditions de culture des CSC nous a permis de simplifier le marquage et le tri cellulaire en supprimant le marquage de l'ALDH. Cette simplification permet de récupérer un nombre plus important de cellules et donc d'augmenter le nombre d'expériences réalisées, tout en diminuant le coût d'un tri cellulaire avec l'achat du kit de marquage de l'ALDH en moins.

2. Etude de l'effet de l'ABT-737 combiné à l'irradiation sur une sous-population de CSC

2.1. Expression basale des différentes protéines de la famille Bcl-2 dans les CSC

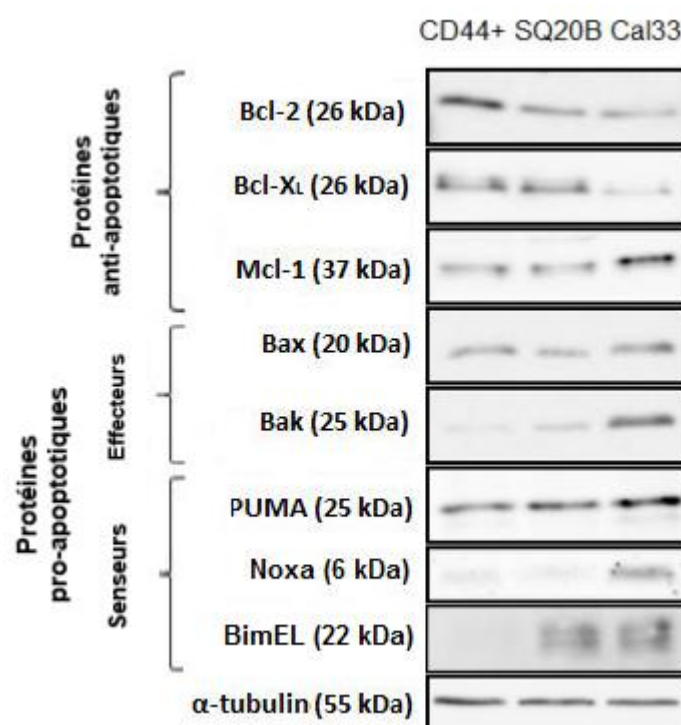


Figure 60 : Expression des protéines de la famille Bcl-2 dans la sous-population CD44^{high}.

Bcl-2	+97%
Bcl-X_L	+20%
Mcl-1	+35%
Bax	+32%
Bak	+7%
PUMA	0%
Noxa	-7%
BimEL	-50%

Tableau 16 : Expression des protéines de la famille Bcl-2 normalisé par l'expression de l'α-tubuline dans les cellules CD44^{high} par rapport à leur expression dans les cellules SQ20B.

Avant d'explorer les effets potentiels de l'ABT-737, associé ou non à l'irradiation, sur la sous-population de CSC issue de la lignée SQ20B, nous avons dans un premier temps déterminé le niveau d'expression des différentes protéines de la famille Bcl-2 dans ces deux populations cellulaires. Comme le montre la Figure 60 et le Tableau 16, la seule différence que nous avons obtenue entre la population mère et les CSC est une **forte augmentation de presque 100% de l'expression basale de la protéine Bcl-2 dans les CSC** par rapport à la lignée parentale. De plus, l'expression de la protéine BH3-only Bim est faiblement exprimée dans les CSC par rapport aux SQ20B. L'expression des autres protéines de la famille Bcl-2 n'est pas significativement modifiée avec des valeurs oscillant entre 1,2 et 0,7 fois la valeur trouvée dans la lignée parentale SQ20B.

Les lignées issues des cancers des VADS sont connues pour exprimer fortement Bcl-2 et/ou Bcl-X_L (Trask *et al.*, 2002 ; Michaud *et al.*, 2009), ce qui en fait des cibles privilégiées des BH3-mimétiques. En ce qui concerne les CSC extraites à partir de lignées de cancers des VADS, nos résultats confirment ceux de Chikamatsu *et al.* (2012) dans les VADS, à savoir une surexpression de Bcl-2. La surexpression des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 a également été rapportée dans les CSC issues de nombreux types de cancers. A titre d'exemples, on peut citer les cellules quiescentes leucémiques (Konopleva *et al.*, 2002), les CSC dans le cancer du sein (Madjd *et al.*, 2009), le carcinome hépatocellulaire (Ma *et al.*, 2008) ou encore le cancer colorectal (Cammalleri *et al.*, 2010). Dans tous ces cas, les stratégies utilisées pour diminuer l'expression de Bcl-2 ou Bcl-X_L dans ces cellules se traduisent par une inversion de leur chimio-résistance ou une sensibilisation à d'autres molécules utilisées en chimiothérapie.

2.2. L'inhibition par l'ABT-737 des protéines Bcl-2 et Bcl-X_L entraîne une augmentation importante de la mort par apoptose dans les CSC

De nombreuses publications et revues ont montré l'implication des CSC dans la chimio- et la radiorésistance de nombreux cancers (Montcharmont *et al.*, 2012 ; Abdullah & Chow, 2013 ; Cojoc *et al.*, 2014) dont ceux des VADS (Monroe *et al.*, 2011 ; Sayed *et al.*, 2011 ; Routray & Mohanty, 2014). L'expression de la protéine Bcl-2, cible de l'ABT-737, étant très significativement augmentée dans cette sous-population par rapport à la lignée totale SQ20B,

nous avons voulu déterminer l'effet du traitement par l'ABT-737 sur cette sous-population, associé ou non à l'irradiation.

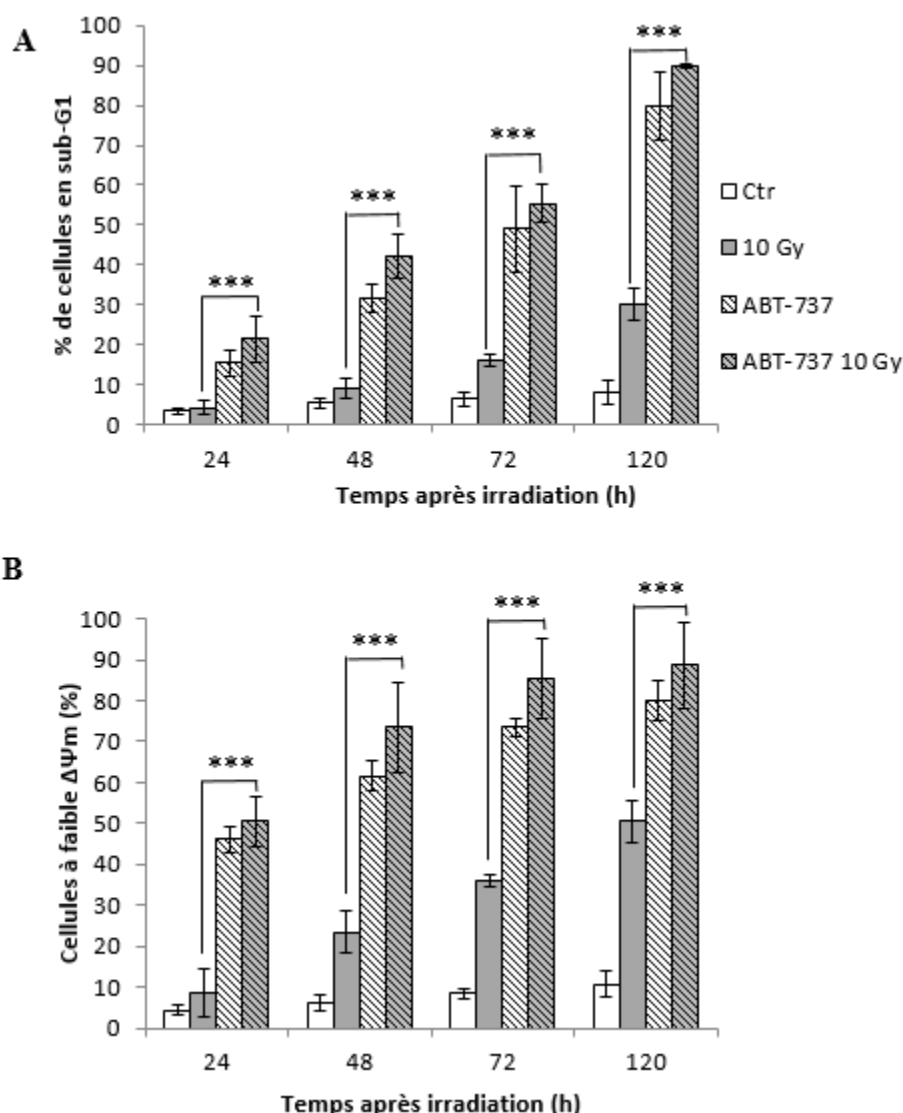


Figure 61 : Effet du traitement par l'ABT-737 sur la mort des CSC.

A. Population en phase sub-G1. **B.** Etude de la chute du potentiel de membrane ($\Delta\Psi_m$).

Pour cela, nous avons tout d'abord mesuré le pourcentage en phase sub-G1 dans les CSC (Figure 61.A.). Nous observons, dès 24 heures après le traitement, une importante augmentation du pourcentage de cellules en phase sub-G1, que ce soit sur les cellules traitées ou les cellules traitées et irradiées (10 Gy : 4,21% \pm 1,76% ; ABT-737 : 15,45% \pm 3,45% ; ABT-737 + 10 Gy : 21,45% \pm 5,87%). Cette augmentation se poursuit jusqu'au temps 120 heures après traitement par l'ABT-737 seul (79,93% \pm 8,50%) ou associé à l'irradiation (89,8%

$\pm 0,44\%$) alors que le pourcentage de cellules en sub-G1 est beaucoup plus modéré après irradiation seule ($30,26\% \pm 4,06\%$).

Cette augmentation du pourcentage de cellules en phase sub-G1 est parfaitement corrélée avec le dysfonctionnement mitochondrial (Figure 61.B.). En effet, on note une chute très importante du potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) à partir de 24 heures (10 Gy : $8,68\% \pm 5,79\%$; ABT-737 : $46,22\% \pm 3,20\%$; ABT-737 + 10 Gy : $50,42\% \pm 5,91\%$) qui continue d'augmenter jusqu'à atteindre presque 90% des CSC au temps 120 heures (10 Gy : $50,54\% \pm 5,23\%$; ABT-737 : $80,00\% \pm 5,02\%$; ABT-737 + 10 Gy : $88,67\% \pm 10,61\%$).

Ces résultats démontrent que **l'inhibition des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 par l'ABT-737, même utilisé seul, est extrêmement efficace sur les CSC** et qu'elle induit fortement l'apoptose. De plus, l'irradiation permet de légèrement potentialiser cet effet pour obtenir jusqu'à 90% de mort cellulaire. Si l'on compare ces résultats à ceux obtenus sur les cellules parentales SQ20B, il semble que l'ABT-737 cible donc préférentiellement les CSC.

Les données concernant l'utilisation de BH3-mimétiques, dont l'ABT-737, sur les CSC sont peu nombreuses. Cependant, et conformément à nos résultats, Zeuner *et al.* (2014) ont récemment démontré l'efficacité de l'ABT-737 qui cible préférentiellement les CSC issues du cancer du poumon non à petites cellules, CSC qui sur-expriment Bcl-X_L. On peut également citer les travaux de Colak *et al.* (2014) ou de Mukherjee *et al.* (2015) qui ont montré que l'ABT-737 n'est pas efficace lorsqu'il est utilisé seul mais qu'il permet d'augmenter l'efficacité thérapeutique respectivement de l'oxaliplatine dans les CSC de cancer du colon ou du 4-HPR dans celles du mélanome. Enfin, des résultats prometteurs viennent récemment d'être publiés concernant l'effet de l'ABT-737 dans la sensibilisation de CSC issues de glioblastomes au témozolomide (Pojo *et al.*, 2015).

Ces données, associées aux nôtres montrent que les BH3-mimétiques, et l'ABT-737 en particulier, sont des outils qui semblent cibler préférentiellement les CSC et ceci dans plusieurs types de cancers. Il apparait donc que l'ABT-737 pourrait être utilisé, dans de nombreuses situations, comme un complément thérapeutique à d'autres chimiothérapies ou à la radiothérapie (dans le cas des VADS) pour éliminer les cellules quiescentes résiduelles, responsables des récives.

2.3. Modification de l'expression des protéines de la famille Bcl-2 après traitement par l'ABT-737

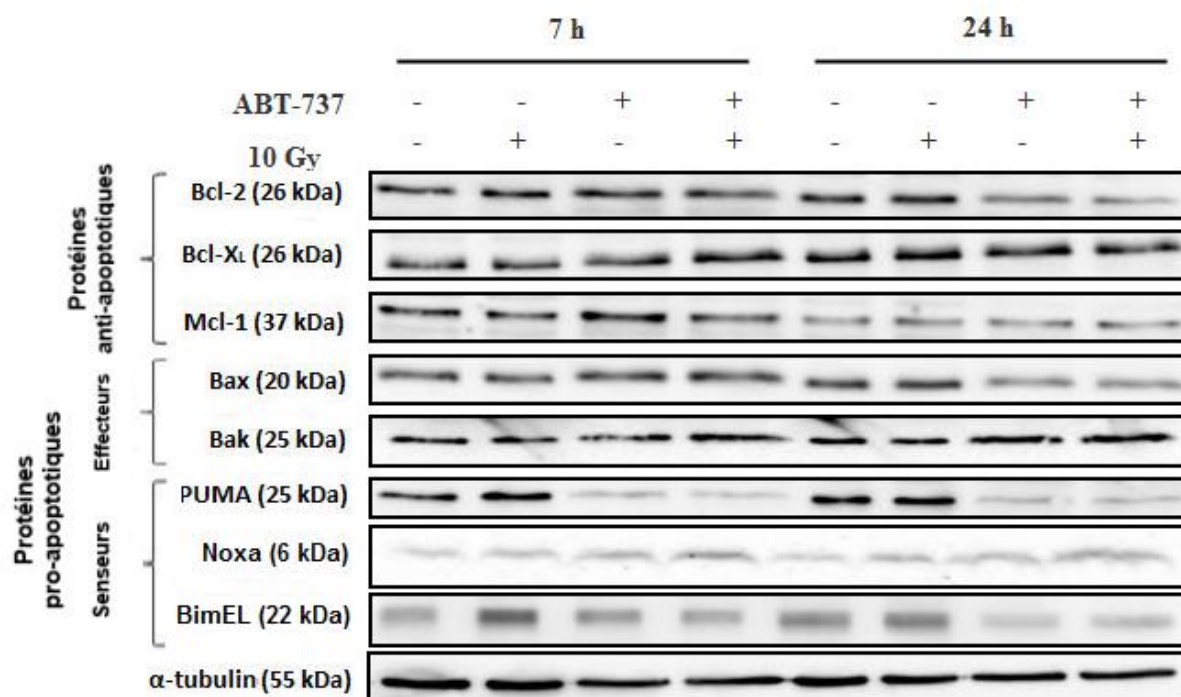


Figure 62 : Modification de l'expression des protéines de la famille Bcl-2 après traitement et/ou irradiation de CSC.

	7 heures			24 heures		
	10 Gy	ABT-737	ABT-737 10 Gy	10 Gy	ABT-737	ABT-737 10 Gy
Bcl-2	+25%	+103%	+53%	+40%	+4%	-19%
Bcl-X_L	-2%	+81%	+89%	+58%	+47%	+42%
Mcl-1	-11%	+110%	+22%	+46%	+43%	+50%
Bax	0%	+99%	+75%	+32%	-3%	+1%
Bak	-7%	+5%	+16%	+19%	+52%	+12%
PUMA	+30%	-54%	-59%	+57%	-35%	-57%
Noxa	+48%	+126%	+158%	+45%	+13%	+181%
Bim_{EL}	+75%	+5%	-13%	+39%	-38%	-58%

Tableau 17 : Expression des protéines de la famille Bcl-2 normalisé par l'expression de l' α -tubuline par rapport au control.

Compte-tenu des résultats spectaculaires obtenus avec l'ABT-737 sur les CSC de la lignée SQ20B, nous avons essayé de comprendre comment l'inhibition de Bcl-2 et/ou Bcl-X_L pouvait déclencher la mort cellulaire dans cette sous-population. Compte-tenu des interrelations complexes et des régulations existant entre les différentes composantes de la famille Bcl-2 (pro-apoptotiques effectrices ou senseurs, anti-apoptotiques) (pour revue, Moldoveanu *et al.*, 2014), nous nous sommes intéressés à l'expression de ces protéines après traitement et/ou irradiation. Etant donné que l'entrée en apoptose se fait de façon plus précoce par rapport à la lignée parentale SQ20B (45% de cellules mortes à 24 heures avec l'ABT-737 seul), nous avons réalisé une analyse d'expression des protéines de la famille Bcl-2 aux temps 7 heures et 24 heures après traitement et/ou irradiation (Figure 62 ; Tableau 17).

Concernant les **protéines anti-apoptotiques** de la famille Bcl-2, l'irradiation modifie peu l'expression de ces protéines au temps 7 heures et nous observons une augmentation modérée (environ 50%) au temps 24 heures. Comparativement, le traitement par l'ABT-737 seul se traduit par une augmentation plus importante de leur expression au temps 7 heures, expression qui redescend au niveau basal pour la protéine Bcl-2 et à 50 % environ pour les protéines Bcl-X_L et Mcl-1. Lors du double traitement, l'expression de ces protéines est sensiblement la même qu'avec l'ABT-737 seul au temps 24 heures.

En ce qui concerne les **protéines pro-apoptotiques effectrices**, l'expression de Bak est inchangée au temps 7 heures après traitement et/ou irradiation et est modérément augmentée 24 heures après traitement par l'ABT-737 seul. L'expression de Bax, quant à elle, est inchangée après irradiation mais augmente aux temps courts, uniquement après traitement par l'ABT-737. Comme pour les protéines anti-apoptotiques, son expression redescend au taux basal à 24 heures.

En ce qui concerne les **protéines BH3-only**, la Figure 62 et le Tableau 17 montrent une augmentation de 50% de l'expression de **Noxa** après irradiation à 10 Gy par rapport au contrôle, augmentation qui se maintient dans le temps. Cette augmentation passe à plus de 150% 7 heures après traitement et irradiation. Le traitement par l'ABT-737 seul augmente, quant à lui, l'expression de Noxa de 120% alors que le traitement par l'ABT-737 seul n'augmente l'expression de Noxa que de 120%. 24 heures après irradiation, l'augmentation de l'expression de Noxa est encore supérieure puisqu'elle atteint 180% après traitement et irradiation par rapport au contrôle. Ceci confirme les résultats que nous avons obtenus sur les cellules SQ20B totales.

En revanche, l'expression de **PUMA** est diminuée après traitement : dès 7 heures, cette diminution est de l'ordre de 50% après traitement par l'ABT-737 et de 60% après traitement et irradiation. Cette diminution d'expression est maintenue dans les mêmes proportions 24 heures après traitement et irradiation. Toutefois, l'expression de PUMA subit une légère augmentation (+30%) 7 heures après une irradiation de 10 Gy, expression qui augmente encore à 57% à 24 heures. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans la lignée parentale SQ20B pour laquelle nous avons également obtenu une diminution de l'expression de PUMA après traitement par l'ABT-737.

De manière surprenante, il en va de même pour la protéine **Bim**. Alors que plusieurs publications démontrent une corrélation entre la sensibilité à l'ABT-737 seul et l'augmentation de l'expression de Bim (Del Gaizo Moore *et al.*, 2007 ; Lheureux *et al.*, 2015), nos résultats sur les CSC ne vont pas dans le même sens. En effet, bien qu'il y ait une augmentation de l'expression après irradiation (+75% à 7 heures et +39% à 24 heures), le traitement par l'ABT-737 a un effet négatif sur l'expression de Bim (ABT-737 : -38% ; ABT-737 + 10 Gy : -58%).

2.4. Transfection des CSC par un siRNA anti-Noxa

Comparativement aux expérimentations menées avec la lignée parentale, nous avons utilisé les siRNAs dirigés contre Noxa afin d'évaluer l'implication de cette protéine, qui est également fortement surexprimée dans les CSC lors de la mort apoptotique de cette sous-population. Une fois encore, ces résultats sont préliminaires et devront être confirmés ultérieurement.

Comme le montre la Figure 63, l'extinction de Noxa ne modifie en rien le nombre de CSC à caspases actives, et ceci, quelles que soient les conditions expérimentales utilisées. Ceci suggère que Noxa, qui est nettement surexprimée après traitement +/- irradiation, n'intervient pas directement dans l'apoptose des CSC.

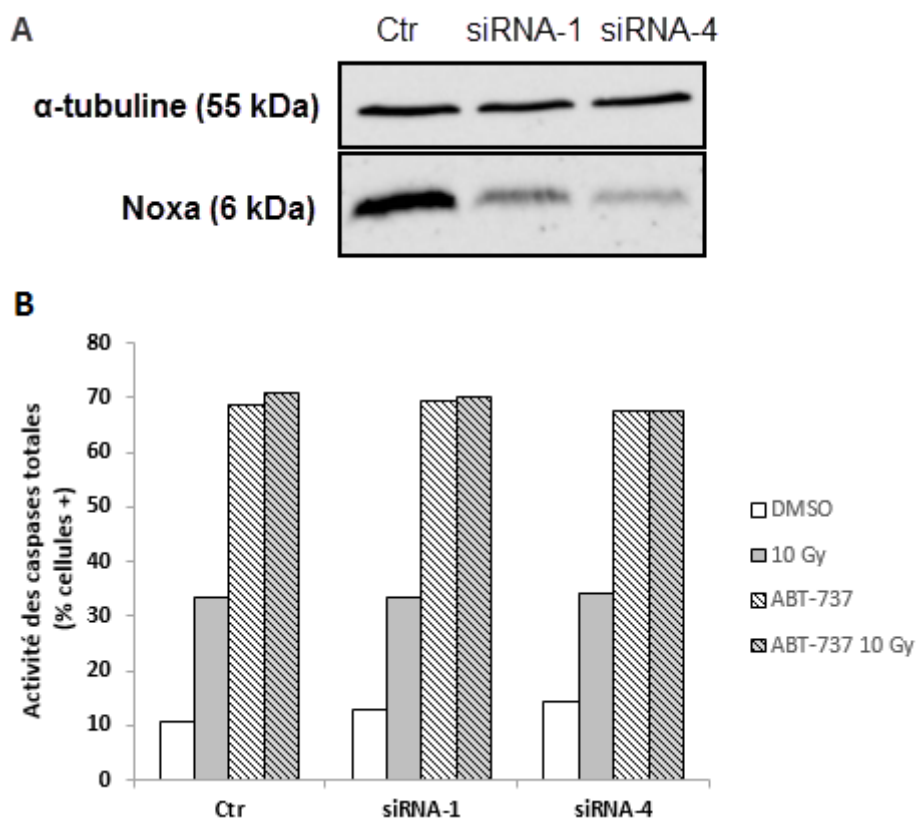


Figure 63 : Effet de l’extinction de Noxa dans les CSC avant traitement par l’ABT-737 et/ou irradiation.

A. Contrôle de l’extinction de la protéine Noxa avant le traitement et/ou l’irradiation. **B.** Activité des caspases totales après transfection au temps 120 heures.

Nos résultats concernant la modification de l’expression des différentes protéines de la famille Bcl-2 après traitement et/ou irradiation ont montré que seule l’expression de Noxa était modifiée de façon très marquée. Parmi les protéines BH3-only, Noxa exerce une faible activité pro-apoptotique en tant que telle, mais joue un rôle crucial dans le réglage fin qui permet le déclenchement du processus de mort apoptotique, ceci en permettant principalement le ciblage de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 vers le protéasome (Czabotar *et al.*, 2007). Il a été montré que l’expression de Noxa est augmentée par de nombreux stimuli qui endommagent l’ADN, que ce soient les esters de phorbol, les UV ou des molécules telles que l’étoposide ou la doxorubicine (Oda *et al.*, 2000 ; Shibue *et al.*, 2003 ; Sesto *et al.*, 2002) mais également après irradiation (Kerr *et al.*, 2012), ceci même indépendamment de p53 (Oda *et al.*, 2000 ; Fei *et al.*, 2002).

Concernant l'ABT-737, il a été rapporté que les stratégies permettant une augmentation de l'expression de Noxa sensibilisent les cellules tumorales à l'ABT-737 (Seveno *et al.*, 2012 ; Roosewinkel *et al.*, 2012 ; Simonin *et al.*, 2013 ; Bates *et al.*, 2013) mais également que l'ABT-737, surtout en association avec d'autres molécules, peut à l'inverse agir en provoquant une augmentation de l'expression de Noxa (Reuland *et al.*, 2012 ; Bertin-Ciftci *et al.*, 2013 ; Zinn *et al.*, 2013). De plus, il a été montré dans certains modèles que la sensibilité à l'ABT-737 dépendait étroitement du ratio Noxa/Mcl-1 (Tromp *et al.*, 2012 ; Geserick *et al.*, 2014). Dans notre modèle cellulaire, ce ratio augmente lorsque les CSC sont traitées avec l'ABT-737 puis irradiées.

Cependant, dans notre cas, l'extinction de Noxa ne modifie en rien l'apoptose induite par l'ABT-737 bien que ce dernier augmente l'expression de Noxa dans notre modèle cellulaire. Dès lors, cette efficacité de l'ABT-737, particulièrement sur les CSC, ne peut être expliquée par une modification de l'expression de Noxa. Il faut envisager que d'autres voies de régulations soient impliquées *via* d'autres protéines de la famille Bcl-2 ou bien *via* la phosphorylation de certaines d'entre elles (Ryu *et al.*, 2014 ; Choudhary *et al.*, 2015)

2.5. Le traitement par l'ABT-737 permet de diminuer la migration et l'invasion des CSC

Outre leur implication dans la chimio- et la radiorésistance tumorale, il apparaît que les CSC sont également fortement concernées par les phénomènes d'invasion et de migration (pour revue, Scheel & Weinberg, 2012). En effet, les nombreuses rechutes après traitements, ainsi que la genèse de cancers à distance, plus résistants, sont des caractéristiques des cancers des VADS de haut grade dont la prise en charge reste problématique à ce jour. L'apparition de métastases résulte du pouvoir invasif de certaines cellules qui ont perdu leur polarité, modifié leur morphologie et acquis une certaine motilité : ces caractéristiques sont regroupées sous la notion de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). De nombreux travaux ont récemment montré le lien existant entre TEM et CSC (Hollier *et al.*, 2009 ; Mani *et al.*, 2008) particulièrement dans les cancers des VADS (Chen *et al.*, 2011 ; Biddle *et al.*, 2011).

Une étude au laboratoire réalisée après une irradiation à 2 Gy a montré, de façon surprenante, que les CSC ont une migration et une invasion qui sont augmentées par rapport

aux cellules non irradiées (Moncharmont *et al.*, résultats non publiés). Compte-tenu de l'efficacité de l'ABT-737 dans l'élimination des CSC (voir ci-dessus), nous avons réalisé quelques expériences préliminaires afin d'évaluer l'effet potentiel de l'ABT-737 sur l'invasion et la migration des CSC.

Afin d'évaluer ces paramètres, les CSC sont traitées par l'ABT-737 dans nos conditions standard et/ou irradiées à 2 Gy, puis sontensemencées en CIM-plate avec ou sans Matrigel afin d'évaluer respectivement l'invasion ou la migration. La Figure 64 montre une augmentation de 50% de la migration des CSC après irradiation à 2 Gy, alors qu'en présence d'ABT-737, cette migration est inhibée de 74% et de 77% lorsque le traitement est combiné à l'irradiation. De plus, l'invasion est également fortement diminuée en présence d'ABT-737, avec une chute de 70% avec le traitement seul et de 82% après traitement et irradiation. Concernant l'irradiation seule, ces résultats confirment ceux précédemment obtenus au laboratoire. En revanche, l'effet obtenu avec l'ABT-737 est extrêmement intéressant puisqu'en plus de son effet antiprolifératif, il semble que ce BH3-mimétique soit également efficace sur l'invasion et la migration des CSC, ce qui devrait potentiellement permettre de diminuer la récurrence tumorale et les métastases. Ces résultats sont cependant préliminaires et demandent d'être confirmés et complétés par une analyse en WB de l'évolution des marqueurs protéiques spécifiques aux deux phénotypes, à savoir la E-cadhérine pour le phénotype épithélial, la N-cadhérine et la vimentine pour le phénotype mésenchymateux.

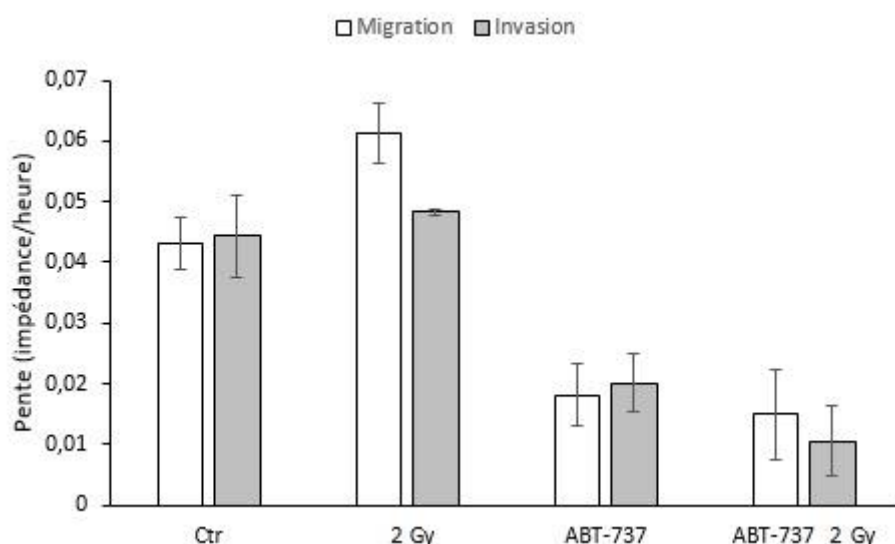


Figure 64 : Migration et invasion des CSC.

Pour les cancers des VADS de mauvais pronostic, les récives locales représentent la principale cause d'échec thérapeutique (60%), devant l'évolution métastatique (30%) et la survenue de nouveaux cancers primitifs. Compte-tenu de ces résultats décevants, la validation de protocoles thérapeutiques innovants demeure toujours un challenge permanent. Il est désormais admis que les cellules souches cancéreuses (CSC) sont au cœur de l'initiation et de la progression des cancers des VADS mais également des rechutes locales et de la dissémination métastatique (Monroe *et al.*, 2011 ; Montcharmont *et al.*, 2012 ; Routray & Mohanty, 2014). Leur ciblage spécifique apparaît donc comme étant une stratégie particulièrement pertinente. Au cours de ces dernières années, plusieurs approches ont été expérimentées, approches reposant sur le ciblage de marqueurs de surface (CD44, CD133 ...), de voies de signalisation spécifiques (Notch, Hedgehog, Wnt ...), de transporteurs de la famille ABC ou encore du microenvironnement dans lequel s'épanouissent les CSC. Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction de ce chapitre, l'utilisation de l'ABT-737 ou plus largement de BH3-mimétiques sur les CSC est plus confidentielle.

En ce qui concerne l'effet de l'ABT-737 et plus largement des BH3-mimétiques sur le pouvoir invasif et migratoire de cellules tumorales, Keitel *et al.* (2014) ont montré dans un modèle cellulaire de cancer du sein que le passage du phénotype épithélial au phénotype mésenchymateux s'accompagne d'une surexpression de Bcl-X_L. Dans ces conditions, l'utilisation de l'ABT-737 inhibe la prolifération et la dissémination de ces cellules, ainsi que leur capacité à former des tumeurs dans un modèle de xénogreffe. Cependant, aucun effet des BH3-mimétiques n'a jusqu'à présent été testé sur la transition épithélio-mésenchymateuse, directement à partir d'une population de CSC.

En conclusion, même si certains sont encore préliminaires, nos résultats montrent combien l'ABT-737 est une molécule prometteuse qui cible préférentiellement les CSC issues de lignées de cancers des VADS. L'ABT-737 permet non seulement de tuer les CSC de façon efficace mais diminuerait leur pouvoir invasif et migratoire, deux paramètres pour lesquels les approches thérapeutiques sont encore décevantes.

Partie 3. Etude préliminaire de l'effet de l'ABT-737 associé au traitement conventionnel combinant le cisplatine et l'irradiation.

Nos résultats obtenus sur la lignée parentale SQ20B et sur la sous-population de CSC suggèrent fortement que l'ABT-737, du fait de son efficacité vis-à-vis des CSC, pourrait être utilisé comme thérapie adjuvante à un traitement conventionnel associant une chimiothérapie et une radiothérapie. Ceci est tout à fait cohérent avec la littérature existante qui montre que, dans des cancers très variés, l'ABT-737 agit la plupart du temps en synergie avec de nombreuses autres molécules (Cisplatine, Etoposide, Paclitaxel, Géfitinib, etc ; Tableau 6) utilisées au cours de traitements conventionnels (Li *et al.*, 2009a ; Oltersdorf *et al.*, 2005 ; Cragg *et al.*, 2007, etc). Concernant les approches thérapeutiques classiques dans la prise en charge des cancers des VADS, les sels de platine occupent une place de choix, en association ou non avec la radiothérapie. Notre travail est le premier qui démontre une synergie de l'ABT-737 avec les rayonnements ionisants dans un modèle de cancer des VADS. Compte-tenu de cet effet, nous avons réalisé quelques expérimentations préliminaires en associant le cisplatine à notre combinaison ABT-737/irradiation afin de voir si on pouvait obtenir un gain thérapeutique supplémentaire, ce qui permettait d'envisager éventuellement une désescalade de dose de cisplatine et ainsi de diminuer les effets secondaires associés aux sels de platine. Ces premiers essais ont été réalisés sur la lignée parentale SQ20B.

1. Etude isobologique des traitements par l'ABT-737 et le cisplatine

Afin d'étudier l'effet combiné du cisplatine et de l'ABT-737, que ce soit avec ou sans irradiation, nous avons réalisé des tests de cytotoxicité au cristal violet en utilisant des concentrations croissantes de chaque agent chimiothérapeutique, seuls et associés (Figure 65 ; Tableau 18). Cela nous a permis de calculer les IC50 de chaque molécule sur la lignée SQ20B.

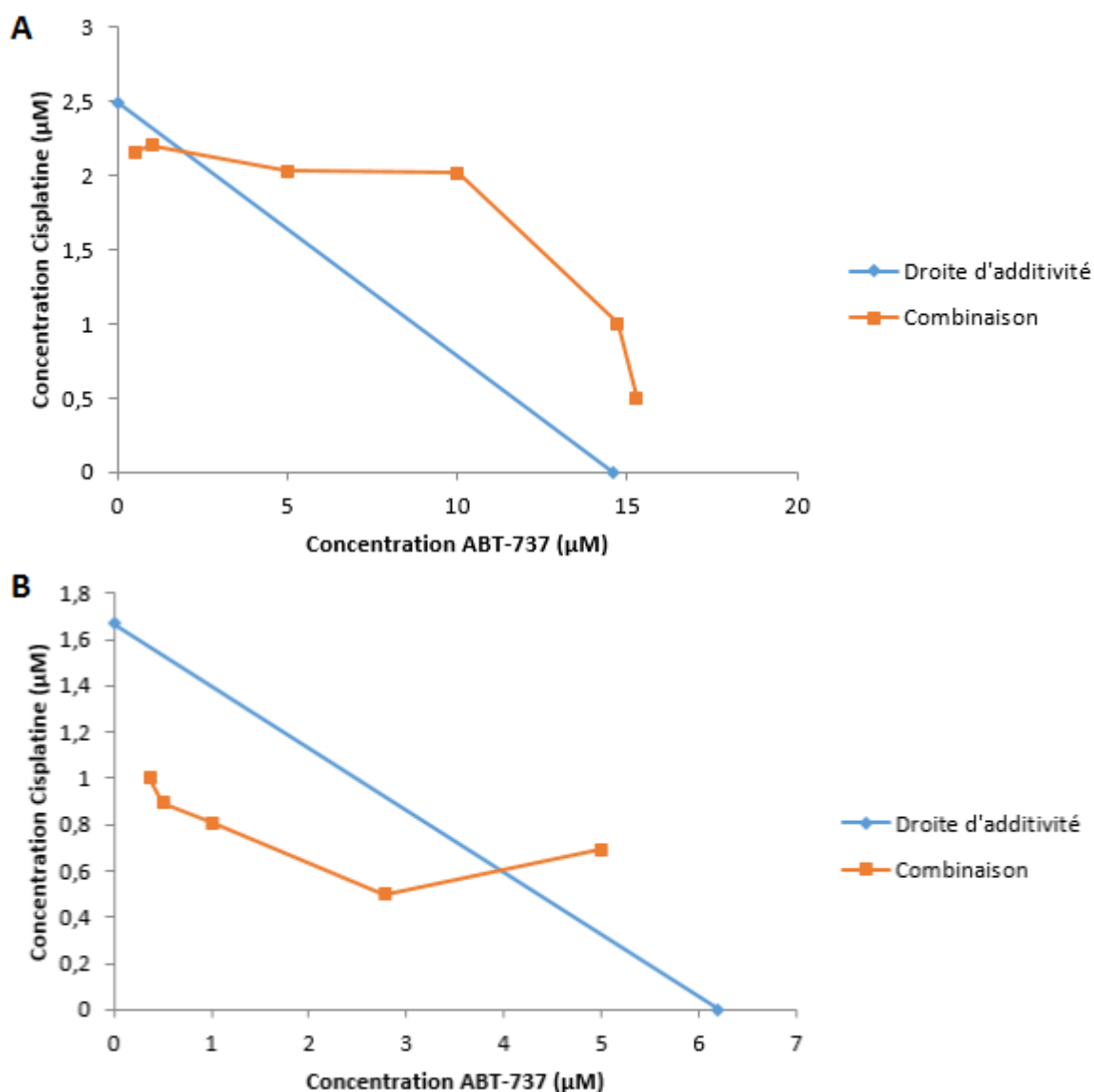


Figure 65 : Etude de la combinaison entre le Cisplatine et l'ABT-737 sur la lignée SQ20B.

A. Sans irradiation. **B.** Avec irradiation.

Les droites d'additivité sont obtenues en mesurant les IC₅₀ de chacune des deux molécules indépendamment l'une de l'autre et en reportant les valeurs sur un graphique. Par exemple, en absence d'irradiation, la dose de cisplatine permettant d'induire 50% de mort cellulaire est de 2,5 µM et celle d'ABT-737 est de 14,5 µM. La viabilité cellulaire est ensuite mesurée en associant les deux molécules à différentes concentrations chacune et de calculer les IC₅₀ associées. Par exemple, 50% de mort cellulaire est obtenue pour une concentration en ABT-737 de 0,5 µM associé à 2,15 µM de cisplatine. Chaque point, pour chaque condition, est alors reporté sur le même graphique, donnant la courbe appelée « combinaison ». Si les points

de la courbe « combinaison » sont proches de la droite d'additivité, les molécules sont additives ; si les points sont en dessous de la droite d'additivité, les molécules sont synergiques ; enfin, si les points sont au-dessus, les molécules sont antagonistes.

Dans un premier temps, nous constatons qu'en absence d'irradiation (Figure 65.A.), les deux molécules ont un profil plutôt additif, voir antagoniste pour de fortes concentrations en ABT-737. En revanche, lorsqu'on associe l'irradiation (Figure 65.B.), ce profil devient synergique pour des faibles concentrations en ABT-737.

Parallèlement, nous avons calculé le « Combination Index » (CI) qui permet de déterminer plus finement les effets des molécules lorsqu'elles sont utilisées conjointement (Tableau 18). Les résultats confirment bien les impressions obtenues avec les courbes précédemment décrites.

	IC50 ABT-737 (μ M)	IC50 Cisplatine (μ M)	Combination index	Description
<i>Sans Irradiation</i>	0,5	2,15	0,897	Faible synergie
	1	2,20	0,946	Additivité
	5	2,03	1,126	Faible antagonisme
	10	2,02	1,430	Antagonisme
	14,71	1	1,147	Faible antagonisme
<i>Avec Irradiation</i>	15,27	0,5	1,313	Antagonisme
	0,36	1	0,66	Synergie
	0,5	0,89	0,62	Synergie
	1	0,81	0,65	Synergie
	2,77	0,5	0,75	Synergie modérée
	5	0,69	1,22	Antagonisme

Tableau 18 : Calcul des « Combination Index » pour chaque condition.

En conclusion de cette première étude, nous avons décidé de réaliser la suite de nos expérimentations en utilisant une concentration en cisplatine de 0,5 μ M et en ABT-737 de 2,5 μ M afin de rester dans une zone de synergie tout en maintenant une concentration en molécules suffisamment importante pour pouvoir observer un effet des deux drogues et ceci sur des temps relativement courts.

2. Etude de la mort cellulaire par apoptose

L'analyse du cycle cellulaire et tout particulièrement les cellules en phase sub-G1 est décrit dans la Figure 66.A. Les effets de l'ABT-737, seul et à 2,5 μ M sont peu significatifs, quel que soit le temps considéré, résultats qui sont en accord avec ceux obtenus dans la partie 2 à 10 μ M. Il en est de même pour un traitement des cellules par le cisplatine, seul et utilisé à la concentration de 0,5 μ M. En associant l'ABT-737 et l'irradiation, on retrouve les effets synergiques déjà décrits précédemment. Les effets de l'association cisplatine 0,5 μ M/irradiation sont en revanche plus modestes qu'avec l'ABT-737 à 72 heures (30,3% \pm 4,2% de cellules en phase sub-G1 avec ABT-737/irradiation contre 16,0% \pm 0,4% avec cisplatine/irradiation) mais plus efficaces à 120 heures (62,6% \pm 2,7% de sub-G1 après ABT/irradiation *versus* 80,2% \pm 0,5% après cisplatine/irradiation). Alors que le traitement combiné ABT-737/cisplatine ne donne pas d'effet significatif, cette combinaison semble plus efficace lorsqu'elle est associée à l'irradiation jusqu'à 72 heures. En revanche, l'utilisation de l'ABT-737 n'apporte rien de plus par rapport au traitement associant le cisplatine à l'irradiation au temps 120 heures. Les résultats concernant l'activité des caspases totales confirment globalement ceux obtenus avec le cycle cellulaire (Figure 66.B).

En résumé, dans la lignée parentale SQ20B, l'association cisplatine 0,5 μ M/irradiation semble être la plus efficace sur le long terme et l'ABT-737 n'améliore pas cette efficacité à la concentration utilisée. Cependant, ces résultats sont encore préliminaires et méritent d'être optimisés avec l'utilisation d'autres concentrations pour chacune de ces molécules. De plus, nous n'avons pas eu le temps d'expérimenter cette association sur la sous-population de CSC. Ce point serait particulièrement intéressant compte-tenu de l'effet obtenu avec l'ABT-737 sur cette sous-population.

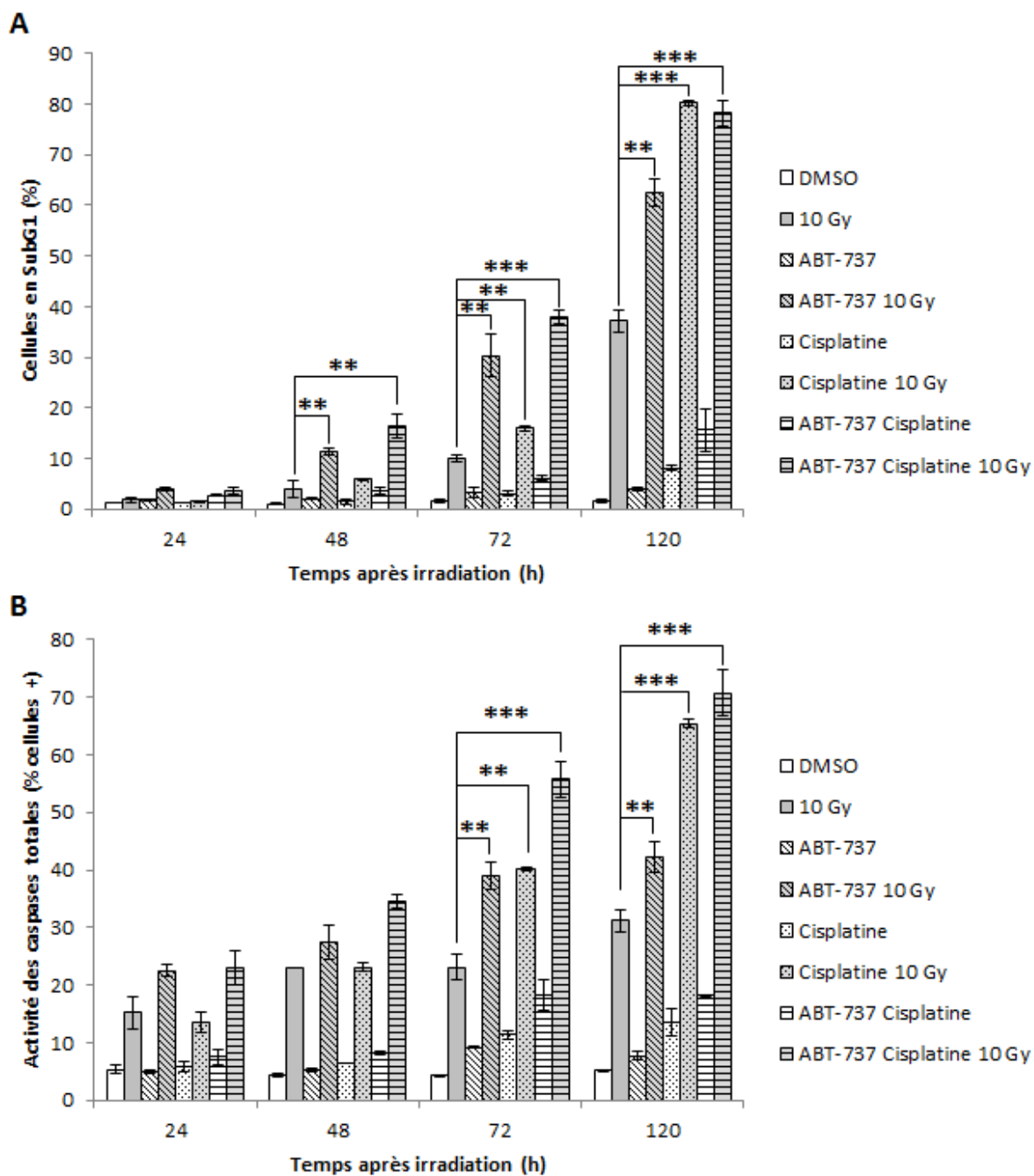


Figure 66 : Etude de la mort cellulaire par apoptose après différents traitements de la lignée SQ20B.

A. Pourcentage de cellules en phase Sub-G1 du cycle cellulaire. **B.** Pourcentage de cellules positives aux caspases totales.

3. Etude *in vivo*

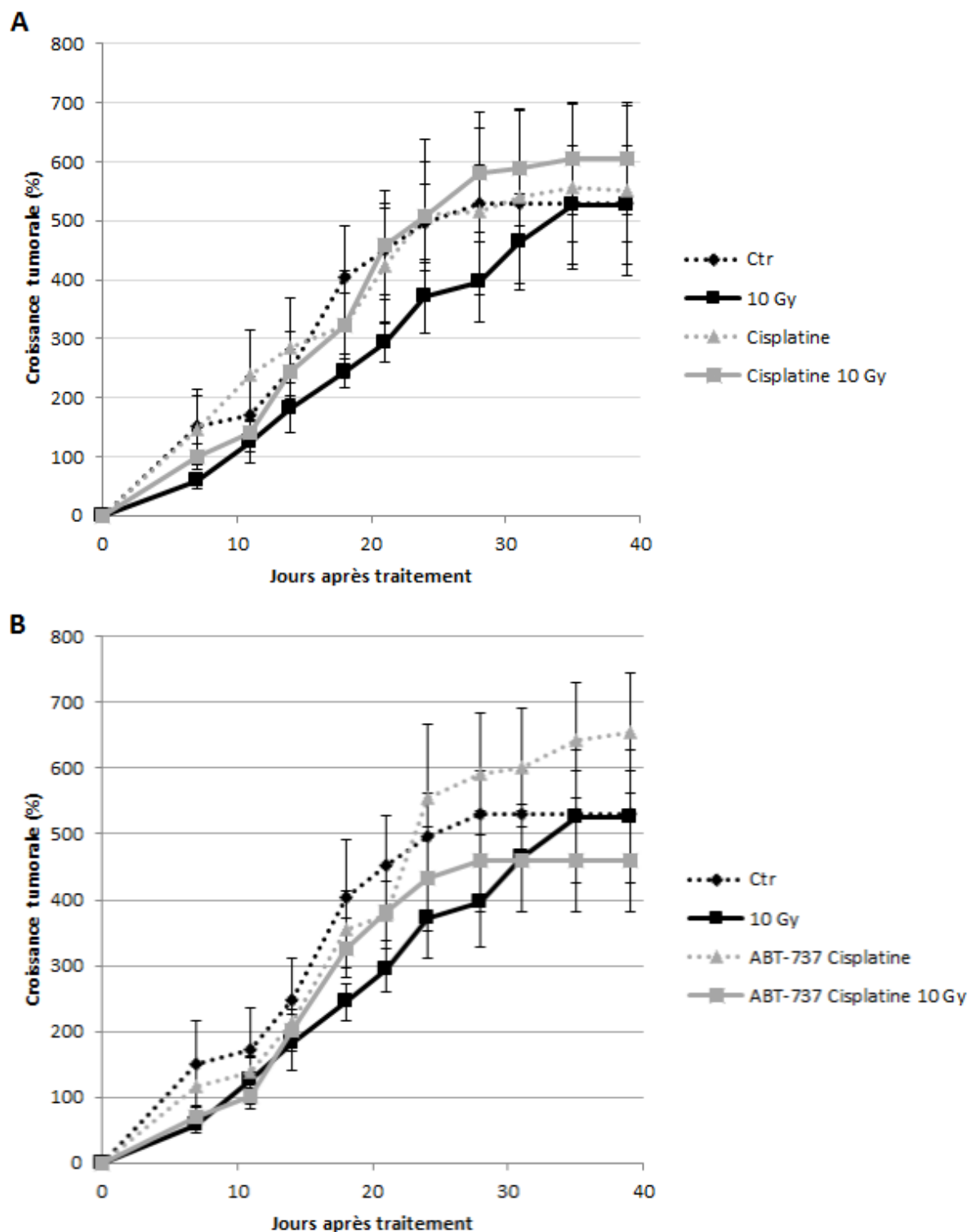


Figure 67 : Etude de la croissance tumorale après xenogreffe de cellules SQ20B et traitement. ABT-737 : 20 mg/kg, Cisplatine : 2 mg/kg ; irradiation : 5 fois 2 Gy.

Nous avons dans un deuxième temps réalisé une première expérimentation *in vivo* concernant cette triple association ABT-737/cisplatine/irradiation.

La Figure 67.A. rassemble les résultats concernant la croissance tumorale obtenus sur des animaux traités par le cisplatine +/- irradiation. A la concentration de cisplatine utilisée (2 mg/kg), nous n'avons pas observé de ralentissement de la croissance tumorale, que ce soit en association avec l'irradiation ou non. En revanche, après addition d'ABT-737 à l'association cisplatine/irradiation (Figure 67.B.), il semble qu'une tendance à un ralentissement de la croissance tumorale s'amorce alors que l'association chimiothérapeutique seule n'a aucun effet bénéfique. Bien évidemment, ces résultats méritent d'être confirmés et surtout d'être affinés, tant sur le plan des concentrations d'ABT-737 et de cisplatine à utiliser, mais également sur un plan pharmacocinétique.

La chimioradiothérapie utilisant les sels de platine reste un traitement de référence pour les cancers des VADS de haut grade et/ou non résécables mais avec une toxicité associée qui reste très problématique. Son association avec d'autres molécules chimiothérapeutiques comme le 5-FU et le cetuximab (Vermorken *et al.*, 2008) puis plus récemment le docetaxel et le cetuximab (Guigay *et al.*, 2015) a donné des résultats encourageants mais encore nettement insuffisants, probablement parce qu'elles ne sont pas suffisamment adaptées pour éliminer les cellules souches cancéreuses à l'origine des récidives locales puis du processus métastatique.

Les données concernant l'utilisation de l'ABT-737 dans les cancers des VADS sont très peu nombreuses. Parmi celles-ci, on peut citer les travaux de Li *et al.* (2009) qui ont montré une synergie d'action *in vitro* entre l'ABT-737 et le cisplatine ou l'étoposide ou bien ceux de Gao *et al.* (2014) concernant une synergie entre l'ABT-737 et la méayamicine B dans des lignées HPV16 positives. En ce qui concerne l'association ABT-737/irradiation, les données ne sont pas plus nombreuses et concernent d'autres types de cancers comme le cancer du poumon non à petites cellules (Kim *et al.*, 2009c) ou le cancer du sein (Li *et al.*, 2012 ; Wu *et al.*, 2014).

En revanche, nombreux sont les travaux qui ont montré que l'ABT-737 pouvait potentialiser l'action de certaines molécules ou bien que des molécules chimiothérapeutiques pouvaient, à l'inverse, sensibiliser des cellules tumorales à l'ABT-

737, ceci dans de nombreux types de cancers (Reuland *et al.*, 2011 ; Touzeau *et al.*, 2011 ; Raats *et al.*, 2011 ; Simonin *et al.*, 2013 ; Jain *et al.*, 2014 ; Mukherjee *et al.*, 2015...).

Nos résultats ont démontré que l'ABT-737 agit de façon synergique avec l'irradiation dans notre modèle de cancer des VADS. Comme l'ABT-737 seul s'est révélé encore plus efficace sur la sous population des CSC, l'approche thérapeutique qui consisterait à associer l'irradiation avec une chimiothérapie conventionnelle et avec l'ABT-737, qui cible préférentiellement les CSC, devrait s'avérer beaucoup plus efficace que les traitements dont nous disposons à l'heure actuelle. Dans ce travail, nos résultats associant l'ABT-737, le cisplatine et l'irradiation n'apportent pas de gain thérapeutique évident, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Cependant, comme il s'agit de résultats préliminaires, les conditions de traitements méritent d'être affinées. En effet, nous pouvons diminuer la concentration de cisplatine *in vitro* dans le but de diminuer la réponse au traitement cisplatine/irradiation au temps longs et voir alors l'évolution de la mort cellulaire lors du traitement ABT-737/cisplatine/irradiation. *In vivo*, d'autres études montrant une efficacité de l'association entre le cisplatine et l'ABT-737 (sans irradiation) ont utilisé une dose d'ABT-737 de 100 mg/kg, c'est-à-dire 5 fois plus élevée que la nôtre (Bray *et al.*, 2009 ; Lieber *et al.*, 2013). Le cisplatine, quant à lui, était utilisé à une dose de 2,5 mg/kg (Bray *et al.*, 2009) et de 1,25 mg/kg (Lieber *et al.*, 2013), 3 mg/kg étant le seuil maximal toxique (Lieber *et al.*, 2013). Dans ce cadre, un autre essai *in vivo* pourrait être envisagé en augmentant la dose d'ABT-737.

Compte-tenu des résultats récents évoqués précédemment dans la littérature, une association cetuximab/ABT-737/irradiation qui ciblerait à la fois la voie de l'EGFR et les protéines anti-apoptotiques mériterait d'être évaluée dans le cadre de cancers des VADS.

Conclusion

La fréquence des cancers des VADS est en perpétuelle augmentation. La forte toxicité associée à l'échec de la prise en charge des formes de haut grade par les traitements conventionnels nous obligent à trouver des stratégies alternatives, plus ciblées et qui tiennent compte de l'hétérogénéité tumorale. Ce travail a permis d'évaluer l'efficacité d'une approche thérapeutique associant l'inhibition de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 à l'irradiation dans les cancers des VADS. Compte-tenu des résultats présentés, ce traitement possède un réel potentiel thérapeutique puisqu'il permet d'augmenter la mort par apoptose de lignées cellulaires issues de ces cancers, très résistantes pour certaines d'entre elles. De plus, cette stratégie cible avec une grande efficacité les cellules souches cancéreuses, ce qui est particulièrement prometteur pour limiter les récurrences locales et la dissémination métastatique. Nous avons plus particulièrement porté notre attention sur la lignée SQ20B, issue d'un carcinome du larynx, qui est la plus résistante de notre panel.

Concernant cette lignée parentale SQ20B, le mécanisme impliquant la synergie entre le traitement par l'ABT-737 et l'irradiation semble liée, au moins en partie, à une forte augmentation de l'expression de la protéine Noxa, une protéine pro-apoptotique « BH3-only » de la famille Bcl-2. Cette protéine est faiblement exprimée dans les cellules SQ20B à l'état basal et son expression est augmentée de près de deux fois, 24 heures après traitement et irradiation. De plus, une diminution de son expression par un siRNA spécifique juste avant le traitement permet de diminuer la mort cellulaire par apoptose, ce qui suggère qu'elle joue probablement un rôle important dans la radiosensibilisation des cellules par l'ABT-737. Parallèlement, l'expression d'autres protéines de la famille Bcl-2 est également modulée après traitement. A partir de nos résultats, nous proposons un schéma (Figure 68) qui résume ces modifications et leur impact potentiel sur le déclenchement de la mort cellulaire.

Après irradiation, l'expression de la protéine Noxa est très augmentée et permet la libération des protéines effectrices Bax et Bak de Mcl-1. Cependant, comme l'expression de Bcl-X_L est également augmentée, Bax et Bak demeurent séquestrées, ce qui empêche le déclenchement de l'apoptose.

Après traitement par l'ABT-737, cette molécule va directement inhiber Bcl-2 et Bcl-X_L, ce qui devrait permettre la libération des protéines pro-apoptotiques Bax/Bak. Cependant, ces protéines effectrices sont toujours inhibées par Mcl-1, bien qu'il y ait une légère augmentation de Noxa. Même si, comme nous l'avons vu en Western blot, une partie des protéines effectrices (Bax en particulier) est capable d'aller s'insérer dans la MEM, il semble que le mécanisme

Conclusion

d'activation qui provoque la formation des pores membranaires soit inefficace pour enclencher la mort cellulaire programmée.

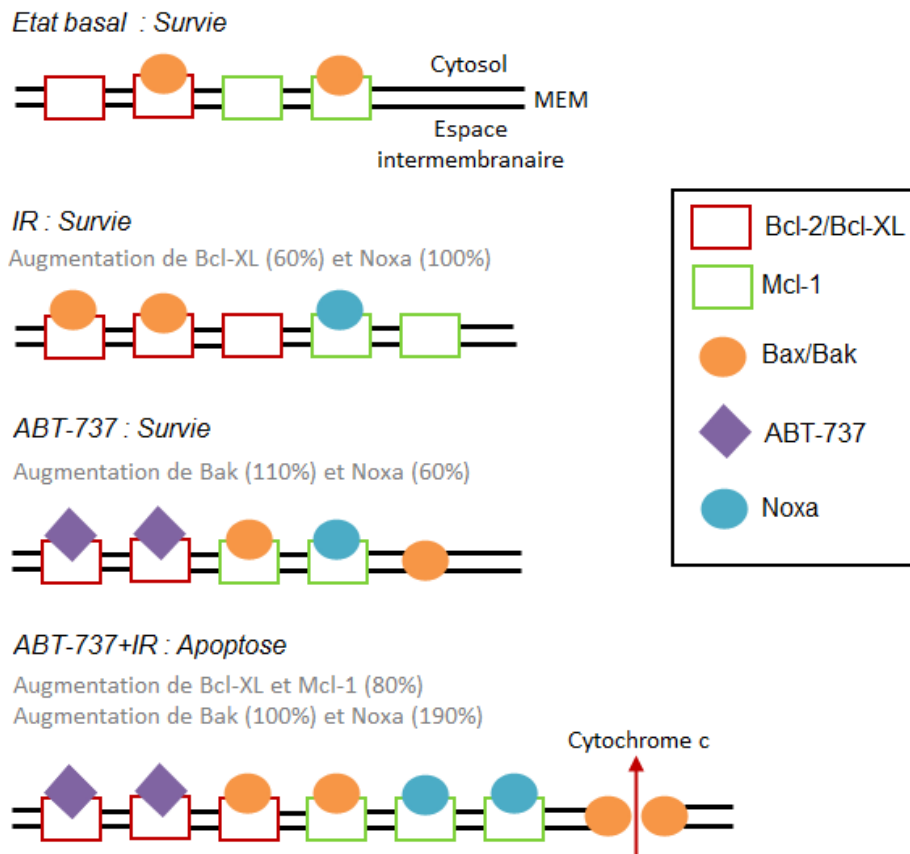


Figure 68 : Schéma de la modulation de l'expression des protéines de la famille Bcl-2 lors des différentes conditions de traitement.

Enfin, lors du traitement combiné, les protéines Bcl-2 et Bcl-X_L sont inhibées par l'ABT-737, ce qui permet de libérer les protéines effectrices, et ceci bien que Bcl-X_L soit augmentée. L'augmentation de l'expression de Mcl-1 est largement contrebalancée par celle de Noxa, ce qui favorise encore la libération des protéines pro-apoptotiques effectrices. Cette double neutralisation de Bcl-2/Bcl-X_L par l'ABT-737 et de Mcl-1 permet donc de libérer Bax et Bak et de déclencher l'apoptose.

Figure 69 : Interactome entre les protéines de la famille Bcl-2 (Garcia-Saez, 2012).

Il faut cependant éviter d'avoir une vision trop simpliste du rôle des différentes protéines de la famille Bcl-2 et de leur niveau d'expression dans la sensibilité d'une cellule tumorale à l'ABT-737, paramètres qui pourraient hypothéquer son utilisation ultérieure comme agent chimio et/ou radiosensibilisant. En effet, il est parfaitement admis, par exemple, que la surexpression de Mcl-1 dans une cellule tumorale diminue sa sensibilité à l'ABT-737 et inversement. *A contrario*, il a été rapporté que le traitement à l'ABT-737, même à court terme, peut dans certains cas favoriser l'expression de Mcl-1. Ainsi, on peut déduire que l'expression de Mcl-1 chez un individu n'exclut pas forcément son traitement par l'ABT-737, surtout si une association thérapeutique donnée provoque une augmentation de l'expression de Noxa, augmentation qui semble indispensable pour induire la synergie entre l'ABT-737 et de nombreuses autres molécules (Ploner *et al.*, 2009). De même, la protéine PUMA agissant comme activatrice de Bax et Bak et comme inhibitrice de protéines anti-apoptotiques (Yu & Zhang, 2008), son expression est sensée favoriser l'apoptose et coopérer avec l'ABT-737 en ce sens, ce qui n'est pas le cas dans notre modèle. Un dernier exemple concerne Bim : cette protéine peut se fixer sur Bcl-2 mais également sur Mcl-1. Cependant, si Noxa est exprimé et se fixe sur Mcl-1, cela libère Bim et va déterminer la sensibilité de la cellule à l'ABT-737. L'ensemble de ces observations souligne le caractère multiparamétrique de la sensibilité d'une cellule tumorale à l'ABT-737. Ce caractère résulte de la complexité du « réseau Bcl-2 » dans lequel les protéines de cette famille interagissent entre elles pour fixer le seuil de déclenchement de l'apoptose. La Figure 69 illustre parfaitement la complexité de ces interactions.

Parmi les questions qui restent en suspens à la suite de notre travail, on peut évoquer, entre autres, le rôle joué par les protéines activatrices directes que sont Bim et PUMA dans la réponse à notre traitement combiné. En effet, nous n'avons pour l'instant pas assez de recul pour replacer ces protéines dans notre modèle expérimental et d'évaluer leur impact dans la régulation du mécanisme proposé dans la Figure 68. De plus, des études de co-immunoprécipitation seraient sans doute aussi, voire plus informatives que la quantification des expressions relatives des protéines pour expliquer plus en détail les résultats que nous avons obtenus.

Notre travail a également permis de révéler un point fondamental, à savoir l'impressionnante efficacité de l'ABT-737 sur les CSC issues de la lignée SQ20B. Non

seulement l'ABT-737 permet d'augmenter rapidement et de façon très importante la mort cellulaire par apoptose des CSC, mais nos premiers résultats indiquent que ce BH3-mimétique permet également de diminuer à la fois le pouvoir invasif et les propriétés migratoires de cette sous-population cellulaire. Compte-tenu des résultats décevants obtenus jusqu'à présent dans la prise en charge des cancers des VADS, à savoir un pourcentage de récurrence très élevé ainsi qu'une dissémination métastatique non maîtrisée, nos données expérimentales sont particulièrement encourageantes puisque notre stratégie permettrait d'éliminer massivement les CSC qui sont probablement responsables des nombreux échecs thérapeutiques.

L'ABT-737 (comme d'autres BH3-mimétiques) possède cette propriété d'agir de façon synergique avec de nombreuses molécules chimiothérapeutiques et, comme nous l'avons montré dans ce travail, les radiations ionisantes. Cette propriété permet soit de sensibiliser des cellules initialement résistantes ou bien de diminuer les concentrations, parfois toxiques ou génératrices d'effets secondaires, de molécules classiquement utilisées en cancérologie. Dans cette optique, nous avons initié une étude préliminaire associant l'ABT-737 à une approche plus traditionnelle des cancers des VADS, à savoir une association de cisplatine + irradiation. Bien que nos résultats montrent un effet synergique des deux molécules jusqu'à 72 heures après traitement, les effets sur le long terme ne présentent pas de différence avec ou sans ABT-737 dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées. Ne s'agissant que de résultats préliminaires, on ne peut toutefois pas en tirer de conclusions définitives. En effet, un travail complémentaire est nécessaire pour optimiser les concentrations respectives des molécules à utiliser dans ce type de protocole. De plus, si l'on tient compte des nouveaux traitements en cours d'étude, particulièrement les thérapies ciblées sur l'EGFR, une étude associant les anticorps anti-récepteurs (Cetuximab, Panitumumab...) ou les inhibiteurs des tyrosine-kinases (Erlotinib, Gefitinib...) à l'ABT-737 et à l'irradiation serait particulièrement pertinente.

Nos résultats obtenus *in vivo*, concernant l'association entre l'irradiation et l'ABT-737 sont, bien que préliminaires, également prometteurs et tendent à confirmer les résultats obtenus *in vitro*. En effet, l'inhibition des protéines Bcl-2/Bcl-X_L associée à la radiothérapie permet de retarder la croissance tumorale de xenogreffes chez la souris. Cependant, lors du premier associant ABT-737/cisplatine/irradiation, la progression tumorale n'est pas modifiée, ce qui n'est pas une fin en soi mais qui nécessite une mise au point plus approfondie de l'approche expérimentale, particulièrement au niveau des concentrations respectives des molécules, du nombre d'injections et des séances d'irradiation à effectuer.

Enfin, dans la quête perpétuelle de marqueurs prédictifs de réponse à des traitements anti-tumoraux, ce travail a également permis de montrer qu'il existe une potentielle corrélation entre l'expression des protéines Bak et Bcl-X_L, la sensibilité à l'ABT-737 et l'irradiation dans nos lignées VADS. Cette hypothèse doit cependant être validée dans un premier temps sur un panel de lignées beaucoup plus large afin d'avoir un indice de confiance suffisant. Cependant, il semble illusoire, compte-tenu de l'interactome évoqué précédemment, d'imaginer utiliser uniquement le niveau d'expression de ces deux protéines mais plutôt d'effectuer un screening complet des différentes composantes de la famille Bcl-2 afin d'anticiper la réponse d'une cellule tumorale à l'ABT-737.

Références bibliographiques

- Abdullah LN, Chow EK. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clin Transl Med*, 2013, 2, p. 3.
- Adhya AK, Srinivasan R, Patel FD. Radiation therapy induced changes in apoptosis and its major regulatory proteins, Bcl-2, Bcl-XL, and Bax, in locally advanced invasive squamous cell carcinoma of the cervix. *Int J Gynecol Pathol*, 2006, 25, p. 281-287.
- Adolphe C, Narang M, Ellis T, *et al.* An in vivo comparative study of sonic, desert and Indian hedgehog pathway activity regulates epidermal stem cell homeostasis. *Development*, 2004, 131, p. 5009-5019.
- Akgul C, Turner PC, White MR, *et al.* Functional analysis of the human MCL-1 gene. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57, p. 684-691.
- Al-Harbi S, Hill BT, Mazumder S, *et al.* An antiapoptotic BCL-2 family expression index predicts the response of chronic lymphocytic leukemia to ABT-737. *Blood*, 2011, 118, p. 3579-3590.
- Alenzi FQ, Lotfy M, Wyse R. Swords of cell death: caspase activation and regulation. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2010, 11, p. 271-280.
- Allaman-Pillet N, Oberson A, Munier F, *et al.* The Bcl-2/Bcl-XL inhibitor ABT-737 promotes death of retinoblastoma cancer cells. *Ophthalmic Genet*, 2013, 34, p. 1-13.
- Allen TD, Rodriguez EM, Jones KD, *et al.* Activated Notch1 induces lung adenomas in mice and cooperates with Myc in the generation of lung adenocarcinoma. *Cancer Res*, 2011, 71, p. 6010-6810.
- Aloy MT, Hadchity E, Bionda C, *et al.* Protective role of Hsp27 protein against gamma radiation-induced apoptosis and radiosensitization effects of Hsp27 gene silencing in different human tumor cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008, 70, p. 543-553.
- Alphonse G, Aloy MT, Broquet P, *et al.* Ceramide induces activation of the mitochondrial/caspases pathway in Jurkat and SCC61 cells sensitive to gamma-radiation but activation of this sequence is defective in radioresistant SQ20B cells. *Int J Radiat Biol*, 2002, 78, p. 821-835.
- Alphonse G, Bionda C, Aloy MT, *et al.* Overcoming resistance to gamma-rays in squamous carcinoma cells by poly-drug elevation of ceramide levels. *Oncogene*, 2004, 23, p. 2703-2715.
- Alphonse G, Maalouf M, Battiston-Montagne P, *et al.* p53-independent early and late apoptosis is mediated by ceramide after exposure of tumor cells to photon or carbon ion irradiation. *BMC Cancer*, 2013, 13, p. 151.
- Alvarez CV, Garcia-Lavandeira M, Garcia-Rendueles ME, *et al.* Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells. *J Mol Endocrinol*, 2012, 49, p. 89-111.
- Andreassen PR, Lohez OD, Lacroix FB, *et al.* Tetraploid state induces p53-dependent arrest of nontransformed mammalian cells in G1. *Mol Biol Cell*, 2001, 12, p. 1315-1328.
- Ang KK, Andratschke NH, Milas L. Epidermal growth factor receptor and response of head-and-neck carcinoma to therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004, 58, 3, p. 959-965.
- Aouacheria A, Arnaud E, Venet S, *et al.* Nr4a1, a human homologue of Nr-13 associates with Bcl-Xs and is an inhibitor of apoptosis. *Oncogene*, 2001, 20, p. 5846-5855.

Ardail D, Maalouf M, Boivin A, *et al.* Diversity and complexity of ceramide generation after exposure of jurkat leukemia cells to irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009, 73, p. 1211-1218.

Armstrong L, Stojkovic M, Dimmick I, *et al.* Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells*, 2004, 22, p. 1142–1151.

Arokium H, Ouerfelli H, Velours G, *et al.* Substitutions of potentially phosphorylatable serine residues of Bax reveal how they may regulate its interaction with mitochondria. *J Biol Chem*, 2007, 282, p. 35104-3512.

Arredondo J, Chernyavsky AI, Jolkovsky DL, *et al.* Receptor-mediated tobacco toxicity: cooperation of the Ras/Raf-1/MEK1/ERK and JAK-2/STAT-3 pathways downstream of alpha7 nicotinic receptor in oral keratinocytes. *FASEB J*, 2006, 20, p. 2093-2101.

Bae J, Leo CP, Hsu SY, *et al.* MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. *J Biol Chem*, 2000, 275, p. 25255-25261.

Bae IH, Lee WS, Yun DH, *et al.* 3-Hydroxy-3',4'-dimethoxyflavone suppresses Bcl-w-induced invasive potentials and stemness in glioblastoma multiforme. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450, p. 704-710.

Baehrecke EH. Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6, p. 505-510.

Baev DV, Krawczyk J, O'Dwyer M, *et al.* The BH3-mimetic ABT-737 effectively kills acute myeloid leukemia initiating cells. *Leuk Res Rep*, 2014, 3, p. 79-82.

Bao S, Wu Q, McLendon RE, *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 2006, 444, p. 756-760.

Baou M, Kolhaas SL, Butterworth M *et al.* Role of NOXA and its ubiquitination in proteasome inhibitor-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica*, 2010, 95, p. 1510-1518.

Bar EE, Chaudhry A, Lin A, *et al.* Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma. *Stem Cells*, 2007, 25, p. 2524-2533.

Barrera-Vilarmau S, Obregón P, de Alba E. Intrinsic order and disorder in the bcl-2 member harakiri: insights into its proapoptotic activity. *PLoS One*, 2011, 6, e21413.

Bassik MC, Scorrano L, Oakes SA, *et al.* Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis. *EMBO J*, 2004, 23, p. 1207-1216.

Basu A, Haldar S. Identification of a novel Bcl-xL phosphorylation site regulating the sensitivity of Taxol or 2-Methoxyestradiol induced apoptosis. *FEBS Lett*, 2003, 538, p. 41-47.

Bates DJ, Danilov AV, Lowrey CH, *et al.* Vinblastine rapidly induces NOXA and acutely sensitizes primary chronic lymphocytic leukemia cells to ABT-737. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12, p. 1504-1514.

Bauer JA, Trask DK, Kumar B, *et al.* Reversal of cisplatin resistance with a BH3 mimetic, (-)-gossypol, in head and neck cancer cells: role of wild-type p53 and Bcl-xL. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4, p. 1096-1104.

- Beckham TH, Lu P, Cheng JC, *et al.* Acid ceramidase-mediated production of sphingosine 1-phosphate promotes prostate cancer invasion through upregulation of cathepsin B. *Int J Cancer*, 2012, 131, p. 2034-2043.
- Bedikian AY, Millward M, Pehamberger H, *et al.* Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J Clin Oncol*, 2006, 24, p. 4738-4745.
- Bektas M, Jolly PS, Müller C, *et al.* Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: role of Bcl-2 expression. *Oncogene*, 2005, 24, p. 178-187.
- Berenbaum MC. The expected effect of a combination of agents: the general solution. *J Theor Biol*, 1985, 114, p. 413-431.
- Berghauer Pont LM, Spoor JK, Venkatesan S, *et al.* The Bcl-2 inhibitor Obatoclax overcomes resistance to histone deacetylase inhibitors SAHA and LBH589 as radiosensitizers in patient-derived glioblastoma stem-like cells. *Genes Cancer*, 2014, 5, p. 445-459.
- Berika M, Elgayyar ME, El-Hashash AH. Asymmetric cell division of stem cells in the lung and other systems. *Front Cell Dev Biol*, 2014, 2, p. 33.
- Bernabeu A, Guillén J, Pérez-Berná AJ, *et al.* Structure of the C-terminal domain of the pro-apoptotic protein Hrk and its interaction with model membranes. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1768, p. 1659-1670.
- Bernhard EJ, Maity A, Muschel RJ, *et al.* Increased expression of cyclin B1 mRNA coincides with diminished G2-phase arrest in irradiated HeLa cells treated with staurosporine or caffeine. *Radiat Res*, 1994, 140, p. 393-400.
- Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, *et al.* Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med*, 2004, 350, 19, p. 1945-1952.
- Beroukhim R, Mermel CH, Porter D, *et al.* The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*, 2010, 463, p. 899-905.
- Bertin-Ciftci J, Barré B, Le Pen J, *et al.* pRb/E2F-1-mediated caspase-dependent induction of Noxa amplifies the apoptotic effects of the Bcl-2/Bcl-xL inhibitor ABT-737. *Cell Death Differ*, 2013, 20, p. 755-764.
- Bertrand G, Maalouf M, Boivin A, *et al.* Targeting Head and Neck Cancer Stem Cells to Overcome Resistance to Photon and Carbon Ion Radiation. *Stem Cell Rev*, 2014, 10, p. 114-126.
- Beuve M, Alphonse G, Maalouf M, *et al.* Radiobiologic parameters and local effect model predictions for head-and-neck squamous cell carcinomas exposed to high linear energy transfer ions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008, 71, p. 635-642.
- Bhat UG, Pandit B, Gartel AL. ARC synergizes with ABT-737 to induce apoptosis in human cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9, p. 1688-1696.
- Bhatnagar N, Li X, Padi SK, *et al.* Downregulation of miR-205 and miR-31 confers resistance to chemotherapy-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Cell Death Dis*, 2010, 1, e105.

- Biddle A, Liang X, Gammon L, *et al.* Cancer stem cells in squamous cell carcinoma switch between two distinct phenotypes that are preferentially migratory or proliferative. *Cancer Res*, 2011, 71, p. 5317-5326.
- Billen LP, Kokoski CL, Lovell JF, *et al.* Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *PLoS Biol*, 2008, 6, p. 147.
- Bionda C, Hadchity E, Alphonse G, *et al.* Radioresistance of human carcinoma cells is correlated to a defect in raft membrane clustering. *Free Radic Biol Med*, 2007, 43, p. 681-694.
- Biroccio A, Candiloro A, Mottotese M, *et al.* Bcl-2 overexpression and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression and in vivo angiogenesis in a breast carcinoma line. *FASEB J*, 2000, 14, p. 652-660.
- Boise LH, González-García M, Postema CE, *et al.* Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*, 1993, 74, p. 597-608.
- Boivin A, Hanot M, Malesys C, *et al.* Transient alteration of cellular redox buffering before irradiation triggers apoptosis in head and neck carcinoma stem and non-stem cells. *PLoS One*, 2011, 6, e14558.
- Bonner JA, Harari PM, Giralt J, *et al.* Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, 2006, 354, 6, p. 567-578.
- Bonner JA, Harari PM, Giralt J, *et al.* Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol*, 2010, 11, 1, p. 21-28.
- Booy EP, Henson ES, Gibson SB. Epidermal growth factor regulates Mcl-1 expression through the MAPK-Elk-1 signalling pathway contributing to cell survival in breast cancer. *Oncogene*, 2011, 30, p. 2367-2378.
- Bornstein S, White R, Malkoski S, *et al.* Smad4 loss in mice causes spontaneous head and neck cancer with increased genomic instability and inflammation. *J Clin Invest*, 2009, 119, p. 3408-3419.
- Borovski T, De Sousa E Melo F, Vermeulen L, *et al.* Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Res*, 2011, 71, p. 634-649.
- Bourguignon LY, Wong G, Earle C, *et al.* Hyaluronan-CD44v3 interaction with Oct4-Sox2-Nanog promotes miR-302 expression leading to self-renewal, clonal formation, and cisplatin resistance in cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma. *J Biol Chem*, 2012, 287, p. 32800-32824.
- Bourhis J, Overgaard J, Audry H, *et al.* Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer: a meta-analysis. *Lancet*, 2006, 368, 9538, p. 843-854.
- Boyd JM, Gallo GJ, Elangovan B, *et al.* Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene*, 1995, 11, p. 1921-1928.
- Boyden SV. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med*, 1962, 115, p. 453-466.

- Brand TM, Iida M, Li C, Wheeler DL. The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer. *Discov Med*, 2011, 12, p. 419-432.
- Bray K, Chen HY, Karp CM, *et al.* Bcl-2 modulation to activate apoptosis in prostate cancer. *Mol Cancer Res*, 2009, 7, p. 1487-1496.
- Brennan SK, Wang Q, Tressler R, *et al.* Telomerase inhibition targets clonogenic multiple myeloma cells through telomere length-dependent and independent mechanisms. *PLoS One*, 2010, 5, e12487.
- Brien G, Debaud AL, Robert X, *et al.* C-terminal residues regulate localization and function of the antiapoptotic protein Bfl-1. *J Biol Chem*, 2009, 284, p. 30257-30263.
- Brinkmann K, Zigrino P, Witt A, *et al.* Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 potentiates cancer chemosensitivity by stabilizing NOXA. *Cell Rep*, 2013, 3, p. 881-891.
- Brock SE, Li C, Wattenberg BW. The Bax carboxy-terminal hydrophobic helix does not determine organelle-specific targeting but is essential for maintaining Bax in an inactive state and for stable mitochondrial membrane insertion. *Apoptosis*, 2010, 15, p. 14-27.
- Buffa FM, Bentzen SM, Daley FM, *et al.* Molecular marker profiles predict locoregional control of head and neck squamous cell carcinoma in a randomized trial of continuous hyperfractionated accelerated radiotherapy. *Clin Cancer Res*, 2004, 10, 11, p. 3745-3754.
- Buron N, Porceddu M, Brabant M, *et al.* Use of human cancer cell lines mitochondria to explore the mechanisms of BH3 peptides and ABT-737-induced mitochondrial membrane permeabilization. *PLoS One*, 2010, 5, e9924.
- Cadet J, Delatour T, Douki T, *et al.* Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res*, 1999, 424, p. 9-21.
- Cammareri P, Scopelliti A, Todaro M, *et al.* Aurora-a is essential for the tumorigenic capacity and chemoresistance of colorectal cancer stem cells. *Cancer Res*, 2010, 70, p. 4655-4665.
- Campàs C, Cosiàlls AM, Barragán M, *et al.* Bcl-2 inhibitors induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Exp Hematol*, 2006, 34, p. 1663-1669.
- Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8, p. 729-740.
- Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*, 2013, 75, p. 685-705.
- Campos L, Rouault JP, Sabido O, *et al.* High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood*, 1993, 81, p. 3091-3096.
- Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, *et al.* The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*, 2000, 2, p. 76-83.
- Čapková M1, Šáchová J2, Strnad H2, *et al.* Microarray analysis of serum mRNA in patients with head and neck squamous cell carcinoma at whole-genome scale. *Biomed Res Int*, 2014, 2014, p. 408683.
- Capaccione KM, Pine SR. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival. *Carcinogenesis*, 2013, 34, p. 1420-1430.

- Carpenter RL, Han W, Paw I, *et al.* HER2 phosphorylates and destabilizes pro-apoptotic PUMA, leading to antagonized apoptosis in cancer cells. *PLoS One*, 2013, 8, e78836.
- Cartron PF, Gallenne T, Bougras G, *et al.* The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol Cell*, 2004, 16, p. 807-818.
- Cartron PF, Arokium H, Oliver L, *et al.* Distinct domains control the addressing and the insertion of Bax into mitochondria. *J Biol Chem*, 2005, 280, p. 10587-10598.
- Cartron PF, Loussouarn D, Campone M, *et al.* Prognostic impact of the expression / phosphorylation of the BH3-only proteins of the BCL-2 family in glioblastoma multiforme. *Cell Death Dis*, 2012, 3, e421.
- Casas E, Kim J, Bendesky A, *et al.* Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Res*, 2011, 71, p. 245-254.
- Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, *et al.* Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, 2004, 23, p. 2825-2837.
- Catuogno S, Cerchia L, Romano G, *et al.* miR-34c may protect lung cancer cells from paclitaxel-induced apoptosis. *Oncogene*, 2013, 32, p. 341-351.
- Chang KY, Tsai SY, Chen SH, *et al.* Dissecting the EGFR-PI3K-AKT pathway in oral cancer highlights the role of the EGFR variant III and its clinical relevance. *J Biomed Sci*, 2013a, 20, p. 43.
- Chang HW, Lee YS, Nam HY, *et al.* Knockdown of β -catenin controls both apoptotic and autophagic cell death through LKB1/AMPK signaling in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cell Signal*, 2013, 25, p. 839-847.
- Chang MJ, Zhong F, Lavik AR, *et al.* Feedback regulation mediated by Bcl-2 and DARPP-32 regulates inositol 1,4,5-trisphosphate receptor phosphorylation and promotes cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111, p. 1186-1191.
- Charvet C, Wissler M, Brauns-Schubert P, *et al.* Phosphorylation of Tip60 by GSK-3 determines the induction of PUMA and apoptosis by p53. *Mol Cell*, 2011, 42, p. 584-596.
- Chattopadhyay A, Chiang CW, Yang E. BAD/BCL-[X(L)] heterodimerization leads to bypass of G0/G1 arrest. *Oncogene*, 2001, 20, 4507-4518.
- Chen TR. Re-evaluation of HeLa, HeLa S3, and HEp-2 karyotypes. *Cytogenet Cell Genet*, 1988, 48, 19-24.
- Chen Z, Putt DA, Lash LH. Enrichment and functional reconstitution of glutathione transport activity from rabbit kidney mitochondria: further evidence for the role of the dicarboxylate and 2-oxoglutarate carriers in mitochondrial glutathione transport. *Arch. Biochem. Biophys*, 2000, 373, p. 193-202.
- Chen T, Yan W, Wells RG, *et al.* Novel inactivating mutations of transforming growth factor-beta type I receptor gene in head-and-neck cancer metastases. *Int J Cancer*, 2001, 93, p. 653-661.
- Chen R, Valencia I, Zhong F, *et al.* Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Cell Biol*, 2004, 166, p. 193-203.

- Chen L, Willis SN, Wei A, *et al.* Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell*, 2005, 17, p. 393-403.
- Chen ZX, Pervaiz S. Bcl-2 induces pro-oxidant state by engaging mitochondrial respiration in tumor cells. *Cell Death Differ*, 2007, 14, p. 1617-1627.
- Chen S, Dai Y, Harada H, *et al.* Mcl-1 down-regulation potentiates ABT-737 lethality by cooperatively inducing Bak activation and Bax translocation. *Cancer Res*, 2007, 67, p. 782-791.
- Chen YC, Chen YW, Hsu HS, *et al.* Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 385, p. 307-313.
- Chen ZX, Pervaiz S. Involvement of cytochrome c oxidase subunits Va and Vb in the regulation of cancer cell metabolism by Bcl-2. *Cell Death Differ*, 2010, 17, p. 408-420.
- Chen ZJ, Zhang B, Pan SH, *et al.* Bcl-2 inhibitor ABT-737 enhances the cisplatin-induced apoptosis in breast cancer T47D cells. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2011a, 33, p. 891-895.
- Chen C, Wei Y, Hummel M, *et al.* Evidence for epithelial-mesenchymal transition in cancer stem cells of head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One*, 2011b, 6, e16466.
- Chen YS, Wu MJ, Huang CY, *et al.* CD133/Src axis mediates tumor initiating property and epithelial-mesenchymal transition of head and neck cancer. *PLoS One*, 2011c, 6, e28053.
- Chen S, Zhang Y, Zhou L, *et al.* A Bim-targeting strategy overcomes adaptive bortezomib resistance in myeloma through a novel link between autophagy and apoptosis. *Blood*, 2014, 124, p. 2687-2697.
- Cheung PF, Cheng CK, Wong NC, *et al.* Granulin-epithelin precursor is an oncofetal protein defining hepatic cancer stem cells. *PLoS One*, 2011, 6, e28246.
- Cheung TH, Rando TA. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14, p. 329-340.
- Chi KN, Gleave ME, Klasa R, *et al.* A phase I dose-finding study of combined treatment with an antisense Bcl-2 oligonucleotide (Genasense) and mitoxantrone in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 2001, 7, p. 3920-3927.
- Chinn SB, Darr OA, Owen JH, *et al.* Cancer stem cells: mediators of tumorigenesis and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 2015, 37, p. 317-326.
- Chinnadurai G, Vijayalingam S, Rashmi R. BIK-the founding member of the BH3-only family proteins: mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenic processes. *Oncogene*, 2008, 27, p. 20-29.
- Chikamatsu K, Ishii H, Takahashi G, *et al.* Resistance to apoptosis-inducing stimuli in CD44+ head and neck squamous cell carcinoma cells. *Head Neck*, 2012, 34, p. 336-343.
- Chiou SH, Yu CC, Lo WL, *et al.* Bmi-1 regulates snail expression and promotes metastasis ability in head and neck squamous cancer-derived ALDH positive cells. *J Oncol*, 2011, pii: 609259.
- Chipuk JE, Green DR. PUMA cooperates with direct activator proteins to promote mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Cell Cycle*, 2009, 8, p. 2692-2696.

- Chittenden T, Flemington C, Houghton AB, *et al.* A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J*, 1995, 14, p. 5589-5596.
- Choi SS, Park IC, Yun JW, *et al.* A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow. *Oncogene*, 1995, 11, p. 1693-1698.
- Chong SJ, Low IC, Pervaiz S. Mitochondrial ROS and involvement of Bcl-2 as a mitochondrial ROS regulator. *Mitochondrion*, 2014, 19, p. 39-48.
- Chou TC, Talalay P. Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. *Trends Pharmacol Sci*, 1983, 4, p. 450-454.
- Chou JJ, Li H, Salvesen GS, *et al.* Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell*, 1999, 96, p. 615-624.
- Choudhary GS, Tat TT, Misra S, *et al.* Cyclin E/Cdk2-dependent phosphorylation of Mcl-1 determines its stability and cellular sensitivity to BH3 mimetics. *Oncotarget*, 2015, 6, p. 16912-16925.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, *et al.* miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102, p. 13944-13949.
- Clarke MR, Imhoff FM, Baird SK. Mesenchymal stem cells inhibit breast cancer cell migration and invasion through secretion of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2. *Mol Carcinog*, 2014.
- Clay MR, Tabor M, Owen JH, *et al.* Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck*, 2010, 32, p. 1195-1201.
- Cleary ML, Smith SD, Sklar J. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell*, 1986, 47, p. 19-28.
- Cleary JM, Lima CM, Hurwitz HI, *et al.* A phase I clinical trial of navitoclax, a targeted high-affinity Bcl-2 family inhibitor, in combination with gemcitabine in patients with solid tumors. *Invest New Drugs*, 2014, 32, p. 937-945.
- Clement MV, Ponton A, Pervaiz S. Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu. *FEBS Lett*, 1998, 440, p. 13-18.
- Cojoc M, Mäberta K, Mudersb MH, *et al.* A role for cancer stem cells in therapy resistance: Cellular and molecular mechanisms. *Semin Cancer Biol*, 2015, 31, p. 16-22.
- Colak S, Zimmerlin CD, Fessler E, *et al.* Decreased mitochondrial priming determines chemoresistance of colon cancer stem cells. *Cell Death Differ*, 2014, 21, p. 1170-1177.
- Comijn J, Berx G, Vermassen P, *et al.* The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell*, 2001, 7, p. 1267-1278.
- Condon LT, Ashman JN, Ell SR, *et al.* Overexpression of Bcl-2 in squamous cell carcinoma of the larynx: a marker of radioresistance. *Int J Cancer*, 2002, 100, p. 472.
- Condorelli F, Salomoni P, Cotteret S, *et al.* Caspase cleavage enhances the apoptosis-inducing effects of BAD. *Mol Cell Biol*, 2001, 21, 3025-3036.

- Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, *et al.* Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, 2004, 350, 19, p. 1937-1944.
- Corbeil D, Röper K, Hellwig A, *et al.* The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem*, 2000, 275, p. 5512-5520.
- Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, *et al.* Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells*, 2006, 24, p. 975-985.
- Cotter FE .Unraveling biologic therapy for Bcl-2-expressing malignancies. *Semin Oncol*, 2004, 31, p. 18-21.
- Coultas L, Terzano S, Thomas T, *et al.* Hrk/DP5 contributes to the apoptosis of select neuronal populations but is dispensable for haematopoietic cell apoptosis. *J Cell Sci*, 2007, 120, p. 2044-2052.
- Cragg MS, Jansen ES, Cook M, *et al.* Treatment of B-RAF mutant human tumor cells with a MEK inhibitor requires Bim and is enhanced by a BH3 mimetic. *J Clin Invest*, 2008, 118, p. 3651-3659.
- Craxton A, Butterworth M, Harper N, *et al.* NOXA, a sensor of proteasome integrity, is degraded by 26S proteasomes by an ubiquitin-independent pathway that is blocked by MCL-1. *Cell Death Differ*, 2012, 19, p. 1424-1434.
- Croxton R, Ma Y, Song L, *et al.* Direct repression of the Mcl-1 promoter by E2F1. *Oncogene*, 2002, 21, p. 1359-1369.
- Czabotar PE, Lee EF, van Delft MF, *et al.* Structural insights into the degradation of Mcl-1 induced by BH3 domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104, p. 6217-6222.
- Da Costa AA, D'Almeida Costa F, Ribeiro AR, *et al.* Low PTEN expression is associated with worse overall survival in head and neck squamous cell carcinoma patients treated with chemotherapy and cetuximab. *Int J Clin Oncol*, 2014.
- Danial NN, Gramm CF, Scorrano L, *et al.* BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature*, 2003, 424, p. 952-956.
- Datta SR, Dudek H, Tao X, *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cellintrinsic death machinery. *Cell*, 1997, 91, 231-241.
- Datta SR, Katsov A, Hu L, *et al.* 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell*, 2000, 6, p. 41-51.
- Datto MB, Li Y, Panus JF, *et al.* Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92, p. 5545-5549.
- Davis SJ, Divi V, Owen JH, *et al.* Metastatic potential of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2010, 136, p. 1260-1266.
- Del Bufalo D, Biroccio A, Leonetti C, *et al.* Bcl-2 overexpression enhances the metastatic potential of a human breast cancer line. *FASEB J*, 1997, 11, p. 947-953.

Del Gaizo Moore V, Brown JR, Certo M, *et al.* Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J Clin Invest*, 2007, 117, p. 112-121.

Del Gaizo Moore V, Letai A. BH3 profiling--measuring integrated function of the mitochondrial apoptotic pathway to predict cell fate decisions. *Cancer Lett*, 2013, 332, p. 202-205.

Del Re DP, Matsuda T, Zhai P, *et al.* Mst1 promotes cardiac myocyte apoptosis through phosphorylation and inhibition of Bcl-xL. *Mol Cell*, 2014, 54, p. 639-650.

Delatre J, Beaudeau JL, Bonnefont-Rousselot D. *Radicaux libres et stress oxydant*. 1^{ère} ed. Paris : Tec & Doc Lavoisier, 2007., I – 584p.

van Delft MF, Wei AH, Mason KD, *et al.* The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell*, 2006, 10, p. 389-399.

Deng X, Gao F, May WS Jr. Bcl2 retards G1/S cell cycle transition by regulating intracellular ROS. *Blood*, 2003, 102, p. 3179-3185.

Deng J, Carlson N, Takeyama K, *et al.* BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents. *Cancer Cell*, 2007, 12, p. 171-185.

Desagher S, Osen-Sand A, Montessuit S, *et al.* Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol Cell*, 2001, 8, p. 601-611.

Dewson G, Kratina T, Sim HW, *et al.* To trigger apoptosis, Bak exposes its BH3 domain and homodimerizes via BH3:groove interactions. *Mol Cell*, 2008, 30, p. 369-380.

Dewson G, Kratina T, Czabotar P, *et al.* Bak activation for apoptosis involves oligomerization of dimers via their alpha6 helices. *Mol Cell*, 2009, 36, p. 696-703.

Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW, *et al.* Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol*, 2000, 10, p. 1201-1204.

Dikomey E, Dahm-Daphi J, Brammer I, *et al.* Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *Int J Radiat Biol*, 1998, 73, p. 269-278.

DiMeo TA, Anderson K, Phadke P, *et al.* A novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer. *Cancer Res*, 2009, 69, p. 5364-5373.

Dimitrova K, Stoeckl M, Dehghani F, *et al.* Overexpression of the Hedgehog signalling pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Onkologie*, 2013, 36, p. 279-286.

Dimri GP, Lee X, Basile G, *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92, p. 9363-9367.

Ding Q, He X, Hsu JM, *et al.* Degradation of Mcl-1 by beta-TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization. *Mol Cell Biol*, 2007, 27, p. 4006-4017.

- Ding Q, Huo L, Yang JY, *et al.* Down-regulation of myeloid cell leukemia-1 through inhibiting Erk/Pin 1 pathway by sorafenib facilitates chemosensitization in breast cancer. *Cancer Res*, 2008, 68, p. 6109–6117.
- Ding SL, Wang JX, Jiao JQ, *et al.* A pre-microRNA- 149 (miR-149) genetic variation affects miR-149 maturation and its ability to regulate the Puma protein in apoptosis. *J Biol Chem*, 2013, 288, p. 26865-26877.
- Dionysopoulos D, Pavlakis K, Kotoula V, *et al.* Cyclin D1, EGFR, and Akt/mTOR pathway. Potential prognostic markers in localized laryngeal squamous cell carcinoma. *Strahlenther Onkol*, 2013, 189, 3, p. 202-214.
- Distelhorst CW, Lam M, McCormick TS. Bcl-2 inhibits hydrogen peroxide-induced ER Ca²⁺ pool depletion. *Oncogene*, 1996, 12, p. 2051–2055.
- Dittmann K, Mayer C, Fehrenbacher B *et al.* Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 2005, 280, p. 31182-31189.
- Domen J, Weissman IL. Hematopoietic stem cells need two signals to prevent apoptosis; BCL-2 can provide one of these, Kitl/c-Kit signaling the other. *J Exp Med*, 2000, 192, p. 1707-1718.
- Dos Santos M, Mercante AM, Louro ID, *et al.* HIF1-alpha expression predicts survival of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *PLoS One*, 2012, 7, 9, p. 45228.
- Echeverry N, Bachmann D, Ke F, *et al.* Intracellular localization of the BCL-2 family member BOK and functional implications. *Cell Death Differ*, 2013, 20, p. 785-799.
- Eckenrode EF, Yang J, Velmurugan GV, *et al.* Apoptosis protection by Mcl-1 and Bcl-2 modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-dependent Ca²⁺ signaling. *J Biol Chem*, 2010, 285, p. 13678-13684.
- Eger A, Aigner K, Sonderegger S, *et al.* DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene*, 2005, 24, p. 2375-2385.
- Egle A, Harris AW, Bouillet P, *et al.* Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101, p. 6164-6169.
- Ekoff M, Kaufmann T, Engström M, *et al.* The BH3-only protein Puma plays an essential role in cytokine deprivation induced apoptosis of mast cells. *Blood*, 2007, 110, p. 3209-3217.
- El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, *et al.* WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res*, 1994, 54, p. 1169-1174.
- Elangovan B, Chinnadurai G. Functional dissection of the pro-apoptotic protein Bik. Heterodimerization with anti-apoptosis proteins is insufficient for induction of cell death. *J Biol Chem*, 1997, 272, p. 24494-24498.
- Ellerby LM; Ellerby HM; Park SM; *et al.* Shift of the cellular oxidation–reduction potential in neural cells xpressing Bcl-2. *J Neurochem*, 1996, 67, p. 1259–1267.

- Erlacher M, Michalak EM, Kelly PN, *et al.* BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood*, 2005, 106, p. 4131-4138.
- Erlich S, Mizrachi L, Segev O, *et al.* Differential interactions between Beclin 1 and Bcl-2 family members. *Autophagy*, 2007, 3, p. 561-568.
- Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res*, 2004, 567, p. 1-61.
- Ewings KE, Hadfield-Moorhouse K, Wiggins CM, *et al.* ERK1/2-dependent phosphorylation of BimEL promotes its rapid dissociation from Mcl-1 and Bcl-xL. *EMBO J*, 2007, 26, p. 2856-2867.
- Ezzoukhry Z, Louandre C, François C, *et al.* The Bcl-2 homology domain 3 (BH3) mimetic ABT-737 reveals the dynamic regulation of bad, a proapoptotic protein of the Bcl-2 family, by Bcl-xL. *Mol Pharmacol*, 2011, 79, p. 997-1004.
- Faber AC, Farago AF, Costa C, *et al.* Assessment of ABT-263 activity across a cancer cell line collection leads to a potent combination therapy for small-cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112, E1288-1296.
- Facchino S, Abdouh M, Chato W, *et al.* BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery. *J Neurosci*, 2010, 30, 10096-10111.
- Fagotto F, Jho Eh, Zeng L, *et al.* Domains of axin involved in protein-protein interactions, Wnt pathway inhibition, and intracellular localization. *J Cell Biol*, 1999, 145, p. 741-756.
- Fan X, Khaki L, Zhu TS, *et al.* NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells*, 2010, 28, p. 5-16.
- Fang H, Harned TM, Kalous O, *et al.* Synergistic activity of fenretinide and the Bcl-2 family protein inhibitor ABT-737 against human neuroblastoma. *Clin Cancer Res*, 2011, 17, p. 7093-7104.
- Farnebo L, Jerhammar F, Ceder R, *et al.* Combining factors on protein and gene level to predict radioresponse in head and neck cancer cell lines. *J Oral Pathol Med*, 2011, 40, 10, p. 739-746.
- Faunes F, Hayward P, Descalzo SM, *et al.* A membrane-associated beta-catenin/Oct4 complex correlates with ground-state pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Development*, 2013, 140, p. 1171-1183.
- Fei P, Bernhard EJ, El-Deiry WS. Tissue-specific induction of p53 targets in vivo. *Cancer Res*, 2002, 62, p. 7316-7327.
- Fiebig AA, Zhu W, Hollerbach C, *et al.* Bcl-XL is qualitatively different from and ten times more effective than Bcl-2 when expressed in a breast cancer cell line. *BMC Cancer*, 2006, 6, p. 213.
- Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, *et al.* Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *N Engl J Med*, 2003, 349, 22, p. 2091-2098.

- Foster KA, Jane EP, Premkumar DR, *et al.* Co-administration of ABT-737 and SAHA induces apoptosis, mediated by Noxa upregulation, Bax activation and mitochondrial dysfunction in PTEN-intact malignant human glioma cell lines. *J neurooncol*, 2014, 120, p. 459-472.
- Fousteri M, Mullenders LH. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res*, 2008, 18, p. 73-84.
- Fox JL, Ismail F, Azad A, *et al.* Tyrosine dephosphorylation is required for Bak activation in apoptosis. *EMBO J*, 2010, 29, p. 3853-3868.
- Fricker M, O'Prey J, Tolkovsky AM, *et al.* Phosphorylation of Puma modulates its apoptotic function by regulating protein stability. *Cell Death Dis*, 2010, 1, e59.
- Furth PA, Bar-Peled U, Li M, *et al.* Loss of anti-mitotic effects of Bcl-2 with retention of anti-apoptotic activity during tumor progression in a mouse model. *Oncogene*, 1999, 18, p. 6589-6596.
- Fury MG, Lee NY, Sherman E, *et al.* A phase 2 study of bevacizumab with cisplatin plus intensity-modulated radiation therapy for stage III/IVB head and neck squamous cell cancer. *Cancer*, 2012, 118, 20, p. 5008-5014.
- Gabellini C, De Luca T, Trisciuglio D, *et al.* BH4 domain of bcl-2 protein is required for its proangiogenic function under hypoxic condition. *Carcinogenesis*, 2013, 34, p. 2558-2567.
- Gallenne T, Gautier F, Oliver L, *et al.* Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members. *J Cell Biol*, 2009, 185, p. 279-290.
- Galmiche A, Ezzoukhry Z, François C, *et al.* BAD, a proapoptotic member of the BCL2 family, is a potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Res*, 2010, 8, p. 1116-1125.
- Gan GN, Eagles J, Keysar SB, *et al.* Hedgehog signaling drives radioresistance and stroma-driven tumor repopulation in head and neck squamous cancers. *Cancer Res*, 2014, 74, p. 7024-7036.
- Gandhi L, Camidge DR, Ribeiro de Oliveira M, *et al.* Phase I study of Navitoclax (ABT-263), a novel Bcl-2 family inhibitor, in patients with small-cell lung cancer and other solid tumors. *J Clin Oncol*, 2011, 29, p. 909-916.
- Ganesan V, Perera MN, Colombini D, *et al.* Ceramide and activated Bax act synergistically to permeabilize the mitochondrial outer membrane. *Apoptosis*, 2010, 15, p. 553-562.
- Gao Y, Trivedi S, Ferris RL, *et al.* Regulation of HPV16 E6 and MCL1 by SF3B1 inhibitor in head and neck cancer cells. *Sci Rep*, 2014, 4, p. 6098.
- García-Sáez AJ, Mingarro I, Pérez-Payá E, *et al.* Membrane-insertion fragments of Bcl-xL, Bax, and Bid. *Biochemistry*, 2004, 43, p. 10930-10943.
- Garcia-Saez AJ. The secrets of the Bcl-2 family. *Cell Death Diff*, 2012, 19, p. 1733-1740
- Gardai SJ, Hildeman DA, Frankel SK, *et al.* Henson Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *J Biol Chem*, 2004, 279, p. 21085-21095.
- Gardner EE, Connis N, Poirier JT, *et al.* Rapamycin rescues ABT-737 efficacy in small cell lung cancer. *Cancer Res*, 2014, 74, p. 2846-2856.

- Gaulard P, d'Agay MF, Peuchmaur M, *et al.* Expression of the bcl-2 gene product in follicular lymphoma. *Am J Pathol*, 1992, 140, p. 1089-1095.
- Germain M, Mathai JP, Shore GC. BH-3-only BIK functions at the endoplasmic reticulum to stimulate cytochrome c release from mitochondria. *J Biol Chem*, 2002, 277, p. 18053–18060.
- Geserick P, Wang J, Feoktistova M, *et al.* The ratio of Mcl-1 and Noxa determines ABT737 resistance in squamous cell carcinoma of the skin. *Cell Death Dis*, 2014, 5, e1412.
- Gilormini M, Wosny AS, Battiston-Montagne P, *et al.* Isolation and characterization of a head and neck squamous cell carcinomas subpopulation having stem cell characteristics. *JoVE*, 2015, in press.
- Ginestier C, Korkaya H, Dontu G, *et al.* The cancer stem cell: the breast cancer driver. *Med Sci*, 2007a, 23, p. 1133-1139.
- Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, *et al.* ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, 2007b, 1, p. 555-567.
- Giorgini S, Trisciuglio D, Gabellini C, *et al.* Modulation of bcl-xL in tumor cells regulates angiogenesis through CXCL8 expression. *Mol Cancer Res*, 2007, 5, p. 761-771.
- Gomez-Bougie P, Ménoret E, Juin P, *et al.* Noxa controls Mule-dependent Mcl-1 ubiquitination through the regulation of the Mcl-1/USP9X interaction. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 413, p. 460-464.
- Goncharenko-Khaider N, Matte I, Lane D, *et al.* Ovarian cancer ascites increase Mcl-1 expression in tumor cells through ERK1/2-Elk-1 signaling to attenuate TRAIL-induced apoptosis. *Mol Cancer*, 2012, 11, p. 84.
- Goodell MA, Brose K, Paradis G, *et al.* Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*, 1996, 183, p. 1797-1806.
- Gradl D, Kühl M, Wedlich D. The Wnt/Wg signal transducer beta-catenin controls fibronectin expression. *Mol Cell Biol*, 1999, 19, 5576-5587.
- Graves PR, Yu L, Schwarz JK, *et al.* The Chk1 protein kinase and the Cdc25C regulatory pathways are targets of the anticancer agent UCN-01. *J Biol Chem*, 2000, 275, p. 5600-5605.
- Greco V, Guo S. Compartmentalized organization: a common and required feature of stem cell niches? *Development*, 2010, 137, p. 1586–1594.
- Grimm S. The ER–mitochondria interface: The social network of cell death. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823, p. 327-334.
- Grinberg M, Sarig R, Zaltsman Y, *et al.* tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis. *J Biol Chem*, 2002, 277, p. 12237-12245.
- Grinstein E, Wernet P. Cellular signaling in normal and cancerous stem cells. *Cell Signal*, 2007, 19, p. 2428-2433.
- Gross A, Yin XM, Wang K, *et al.* Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem*, 1999, 274, p. 1156-1163.

- Guan GF, Zhang DJ, Zheng Y, *et al.* Abnormal Wnt signaling and overexpression of ABCG2 contributes to drug efflux properties of side population cells in nasopharyngeal carcinoma. *Mol Med Rep*, 2015, 12, 4352-4357.
- Guigay J, Fayette J, Dillies AF, *et al.* Cetuximab, docetaxel, and cisplatin as first-line treatment in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: a multicenter, phase II GORTEC study. *Ann Oncol*, 2015, 26, p. 1941-1947.
- Guo R, Hu N, Kandadi MR, *et al.* Facilitated ethanol metabolism promotes cardiomyocyte contractile dysfunction through autophagy in murine hearts. *Autophagy*, 2012, 8, p. 593-608.
- Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, *et al.* Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell*, 2005, 9, p. 617-628.
- Hadchity E, Aloy MT, Paulin C, *et al.* Heat shock protein 27 as a new therapeutic target for radiation sensitization of head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Ther*, 2009, 17, p. 1387-1394.
- von Haefen C, Wieder T, Gillissen B, *et al.* Ceramide induces mitochondrial activation and apoptosis via a Bax-dependent pathway in human carcinoma cells. *Oncogene*, 2002, 21, p. 4009-4019.
- Hagenbuchner J, Kiechl-Kohlendorfer U, Obexer P, *et al.* A novel Mcl1 variant inhibits apoptosis via increased Bim sequestration. *Oncotarget*, 2013, 4, p. 1241-1252.
- Hajra KM, Chen DY, Fearon ER. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res*, 2002, 62, p. 1613-1618.
- Haldar S, Basu A, Croce CM. Serine-70 is one of the critical sites for drug induced Bcl2 phosphorylation in cancer cells. *Cancer Res*, 1998, 58, p. 1609-1615.
- Han J, Goldstein LA, Gastman BR, *et al.* Disruption of Mcl-1.Bim complex in granzyme B-mediated mitochondrial apoptosis. *J Biol Chem*, 2005, 280, p. 16383-16392.
- Han J, Xu X, Qin H, *et al.* The molecular mechanism and potential role of heat shock-induced p53 protein accumulation. *Mol Cell Biochem*, 2013, 378, p. 161-169.
- Hann CL, Daniel VC, Sugar EA, *et al.* Therapeutic efficacy of ABT-737, a selective inhibitor of BCL-2, in small cell lung cancer. *Cancer Res*, 2008, 68, p. 2321-2328.
- Hanot M, Boivin A, Malésys C, *et al.* Glutathione depletion and carbon ion radiation potentiate clustered DNA lesions, cell death and prevent chromosomal changes in cancer cells progeny. *PLoS One*, 2012, 7, e44367.
- Hao Z, Duncan GS, Su YW, *et al.* The E3 ubiquitin ligase Mule acts through the ATM-p53 axis to maintain B lymphocyte homeostasis. *J Exp Med*, 2012a, 209, p. 173-186.
- Hao H, Chen C, Rao XM, *et al.* E2F-1- and E2Ftr-mediated apoptosis: the role of DREAM and HRK. *J Cell Mol Med*, 2012b, 16, p. 605-615.
- Hao JW, Mao XP, Ding DG, *et al.* The effect of cell killing by ABT-737 synergized with docetaxel in human prostate cancer PC-3 cells. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 2012c, 50, p. 161-165.

- Harada H, Quearry B, Ruiz-Vela A, *et al.* Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101, p. 15313-15317.
- Harley ME, Allan LA, Sanderson HS, *et al.* Phosphorylation of Mcl-1 by CDK1-cyclin B1 initiates its Cdc20-dependent destruction during mitotic arrest. *EMBO J*, 2010, 29, p. 2407-2420.
- Harrison H, Farnie G, Howell SJ, *et al.* Regulation of breast cancer stem cell activity by signaling through the Notch4 receptor. *Cancer Res*, 2010, 70, p. 709-718.
- Hauck P, Chao BH, Litz J, *et al.* Alterations in the Noxa/Mcl-1 axis determine sensitivity of small cell lung cancer to the BH3 mimetic ABT-737. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8, p. 883-892.
- Häyry V, Mäkinen LK, Atula T, *et al.* Bmi-1 expression predicts prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Br J Cancer*, 2010, 102, p. 892-897.
- He CH, Waxman AB, Lee CG, *et al.* Bcl-2-related protein A1 is an endogenous and cytokine-stimulated mediator of cytoprotection in hyperoxic acute lung injury. *J Clin Invest*, 2005, 115, p. 1039-1048.
- He L, Torres-Lockhart K, Forster N, *et al.* Mcl-1 and FBW7 control a dominant survival pathway underlying HDAC and Bcl-2 inhibitor synergy in squamous cell carcinoma. *Cancer Discov*, 2013, 3, p. 324-337.
- Herman MD, Nyman T, Welin M, *et al.* Completing the family portrait of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins: crystal structure of human Bfl-1 in complex with Bim. *FEBS Lett*, 2008, 582, p. 3590-3594.
- Hershko T, Ginsberg D. Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J Biol Chem*, 2004, 279, p. 8627-8634.
- Hinds MG, Smits C, Fredericks-Short R, *et al.* Bim, Bad and Bmf: intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets. *Cell Death Differ*, 2007, 14, p. 128-136.
- Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, *et al.* A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101, p. 14228-14233.
- Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93, p. 266-276.
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, *et al.* Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, 1993, 5, p. 241-251.
- Hoffmeyer K, Raggioli A, Rudloff S, *et al.* Wnt/ β -catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells. *Science*, 2012, 336, p. 1549-1554.
- Hollier BG, Evans K, Mani SA. The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies, *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2009, 14, p. 29-43.
- Hoogsteen IJ, Marres HA, Bussink J, *et al.* Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinomas: predictive value and clinical relevance of hypoxic markers. *Head Neck*, 2007, 29, p. 591-604.

- Hsu SY, Kaipia A, McGee E, *et al.* Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94, p. 12401-12406.
- Hsu SL, Hsu JW, Liu MC, *et al.* Retinoic acid-mediated G1 arrest is associated with induction of p27(Kip1) and inhibition of cyclin-dependent kinase 3 in human lung squamous carcinoma CH27 cells. *Exp Cell Res*, 2000, 258, p. 322-331.
- Huang DC, Adams JM, Cory S. The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. *EMBO J*, 1998, 17, p. 1029-1039.
- Huang HM, Huang CJ, Yen JJ. Mcl-1 is a common target of stem cell factor and interleukin-5 for apoptosis prevention activity via MEK/MAPK and PI-3K/Akt pathways. *Blood*, 2000, 96, p. 1764-1771.
- Huang S, Okumura K, Sinicrope FA. BH3 mimetic obatoclax enhances TRAIL-mediated apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res*, 2009a, 15, p. 150-159.
- Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, *et al.* Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res*, 2009b, 69, p. 3382-3389.
- Huang SF, Cheng SD, Chuang WY, *et al.* Cyclin D1 overexpression and poor clinical outcomes in Taiwanese oral cavity squamous cell carcinoma. *World J Surg Oncol*, 2012, 10, p. 40.
- Huang H, Hu X, Eno CO, *et al.* An interaction between Bcl-xL and the voltage-dependent anion channel (VDAC) promotes mitochondrial Ca^{2+} uptake. *J Biol Chem*, 2013, 288, p. 19870-19881.
- Huber O, Korn R, McLaughlin J, *et al.* Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev*, 1996, 59, p. 3-10.
- Hübner A, Cavanagh-Kyros J, Rincon M, *et al.* Functional cooperation of the proapoptotic Bcl2 family proteins Bmf and Bim in vivo. *Mol Cell Biol*, 2010, 30, p. 98-105.
- Hughes PD, Belz GT, Fortner KA, *et al.* Apoptosis regulators Fas and Bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity. *Immunity*, 2008, 28, p. 197-205.
- Huntly BJ, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5, p. 311-321.
- Iervolino A, Trisciuglio D, Ribatti D, *et al.* Bcl-2 overexpression in human melanoma cells increases angiogenesis through VEGF mRNA stabilization and HIF-1-mediated transcriptional activity. *FASEB J*, 2002, 16, p. 1453-1455.
- Igaki T, Miura M. Role of Bcl-2 family members in invertebrates. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1644, p. 73-81.
- Iglesias-Serret D, Piqué M, Gil J, *et al.* Transcriptional and translational control of Mcl-1 during apoptosis. *Arch Biochem Biophys*, 2003, 417, p. 141-152.
- Imaizumi K, Tsuda M, Imai Y, *et al.* Molecular cloning of a novel polypeptide, DP5, induced during programmed neuronal death. *J Biol Chem*, 1997, 272, p. 18842-18848.

- Inohara N, Ding L, Chen S, *et al.* Harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *EMBO J*, 1997, 16, p. 1686-1694.
- Inoshita S, Takeda K, Hatai T, *et al.* Phosphorylation and inactivation of myeloid cell leukemia 1 by JNK in response to oxidative stress. *J Biol Chem*, 2002, 277, p. 43730-43734.
- Jagani Z, Wiederschain D, Loo A, *et al.* The Polycomb group protein Bmi-1 is essential for the growth of multiple myeloma cells. *Cancer Res*, 2010, 70, p. 5528-5538.
- Jain N, Zhang T, Kee WH, *et al.* Protein kinase C delta associates with and phosphorylates Stat3 in an interleukin-6-dependent manner. *J Biol Chem*, 1999, 274, p. 24392-24400.
- Jain HV, Richardson A, Meyer-Hermann M, *et al.* Exploiting the synergy between carboplatin and ABT-737 in the treatment of ovarian carcinomas. *PLoS One*, 2014, 9, e81582.
- Jamil S, Mojtabavi S, Hojabrpour P, *et al.* An essential role for MCL-1 in ATR-mediated CHK1 phosphorylation. *Mol Biol Cell*, 2008, 19, p. 3212-3220.
- Jamil S, Stoica C, Hackett TL, *et al.* MCL-1 localizes to sites of DNA damage and regulates DNA damage response. *Cell Cycle*, 2010, 9, p. 2843-2855.
- Janumyan YM, Sansam CG, Chattopadhyay A, *et al.* Bcl-xL/Bcl-2 coordinately regulates apoptosis, cell cycle arrest and cell cycle entry. *EMBO J*, 2003, 22, p. 5459-5470.
- Jenal M, Batliner J, Reddy VA, *et al.* The anti-apoptotic gene BCL2A1 is a novel transcriptional target of PU1. *Leukemia*, 2010, 24, p. 1073-1076.
- Jensen AD, Nikoghosyan AV, Poulakis M, *et al.* Combined intensity-modulated radiotherapy plus raster-scanned carbon ion boost for advanced adenoid cystic carcinoma of the head and neck results in superior locoregional control and overall survival. *Cancer*, 2015, Epub ahead of print.
- Ji F, Zhang H, Wang Y, *et al.* MicroRNA-133a, downregulated in osteosarcoma, suppresses proliferation and promotes apoptosis by targeting Bcl-xL and Mcl-1. *Bone*, 2013, 56, p. 220-226.
- Jiang CC, Wroblewski D, Yang F, *et al.* Human melanoma cells under endoplasmic reticulum stress are more susceptible to apoptosis induced by the BH3 mimetic obatoclax. *Neoplasia*, 2009, 11, p. 945-955.
- John K, Wu J, Lee BW, Farah CS. MicroRNAs in Head and Neck Cancer. *Int J Dent*, 2013, 2013, p. 650218.
- de Jong MC, Pramana J, van der Wal JE, *et al.* CD44 expression predicts local recurrence after radiotherapy in larynx cancer. *Clin Cancer Res*, 2010, 16, p. 5329-5338.
- Kaanders JH, Wijffels KI, Marres HA, *et al.* Pimonidazole binding and tumor vascularity predict for treatment outcome in head and neck cancer. *Cancer Res*, 2002, 62, 23, p. 7066-7074.
- Kajihara R, Sakamoto H, Tanabe K, *et al.* Protein phosphatase 6 controls BCR-induced apoptosis of WEHI-231 cells by regulating ubiquitination of Bcl-xL. *J Immunol*, 2014, 192, p. 5720-5729.
- Kajita M, Itoh Y, Chiba T *et al.* Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol*, 2001, 153, p. 893-904.

- Kamer I, Sarig R, Zaltsman Y, *et al.* Proapoptotic BID is an ATM effector in the DNA-damage response. *Cell*, 2005, 122, p. 593-603.
- Karaayvaz M, Zhai H, Ju J. miR-129 promotes apoptosis and enhances chemosensitivity to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Cell Death Dis*, 2013, 4, e659.
- Kariya S, Ogawa Y, Yoshida S, *et al.* X-irradiation enhances the expression of Bcl-2 in HL-60 cells: the resulting effects on apoptosis and radiosensitivity. *Int J Mol Med*, 1999, 3, p. 145-152.
- Karl E, Warner K, Zeitlin B, *et al.* Bcl-2 acts in a proangiogenic signaling pathway through nuclear factor-kappaB and CXC chemokines. *Cancer Res*, 2005, 65, p. 5063-5069.
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, *et al.* Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*, 1991, 51, p. 6304-6311.
- Kathania M, Raje CI, Raje M, *et al.* Bfl-1/A1 acts as a negative regulator of autophagy in mycobacteria infected macrophages. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43, p. 573-585.
- Kater AP, Evers LM, Remmerswaal EB, *et al.* CD40 stimulation of B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells enhances the anti-apoptotic profile, but also Bid expression and cells remain susceptible to autologous cytotoxic T-lymphocyte attack. *Br J Haematol*, 2004, 127, p. 404-415.
- Katoh Y, Katoh M. Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr Mol Med*, 2009, 9, p. 873-886.
- Kathalia VP, Mussak EN, Chow SS, *et al.* Genome-wide transcriptional profiling in human squamous cell carcinoma of the skin identifies unique tumor-associated signatures. *J Dermatol*, 2006, 33, p. 309-318.
- Ke N, Godzik A, Reed JC. Bcl-B, a novel Bcl-2 family member that differentially binds and regulates Bax and Bak. *J Biol Chem*, 2001, 276, p. 12481-12484.
- Ke F, Voss A, Kerr JB, *et al.* BCL-2 family member BOK is widely expressed but its loss has only minimal impact in mice. *Cell Death Differ*, 2012, 19, p. 915-925.
- Ke F, Bouillet P, Kaufmann T, *et al.* Consequences of the combined loss of BOK and BAK or BOK and BAX. *Cell Death Dis*, 2013, 4, e650.
- Keitel U, Scheel A, Thomale J, *et al.* Bcl-xL mediates therapeutic resistance of a mesenchymal breast cancer cell subpopulation. *Oncotarget*, 2014, 5, p. 11778-11791.
- Kerr JB, Hutt KJ, Michalak EM, *et al.* DNA damage-induced primordial follicle oocyte apoptosis and loss of fertility require TAp63-mediated induction of Puma and Noxa. *Mol Cell*, 2012, 48, p. 343-352.
- Khaw SL, Mérimo D, Anderson MA, *et al.* Both leukaemic and normal peripheral B lymphoid cells are highly sensitive to the selective pharmacological inhibition of prosurvival Bcl-2 with ABT-199. *Leukemia*, 2014, 28, p. 1207-1215.
- Kilbride SM, Farrelly AM, Bonner C, *et al.* AMP-activated protein kinase mediates apoptosis in response to bioenergetic stress through activation of the pro-apoptotic Bcl-2 homology domain-3-only protein BMF. *J Biol Chem*, 2010, 285, p. 36199-36206.

- Kim BC, Mamura M, Choi KS, *et al.* Transforming growth factor beta 1 induces apoptosis through cleavage of BAD in a Smad3-dependent mechanism in FaO hepatoma cells. *Mol Cell Biol*, 2002a, 22, p. 1369-1378.
- Kim K, Lu Z, Hay ED. Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol Int*, 2002b, 26, p. 463-476.
- Kim JY, Ahn HJ, Ryu JH, *et al.* BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Exp Med*, 2004a, 199, p. 113-124.
- Kim HR, Wheeler MA, Wilson CM *et al.* Hyaluronan facilitates invasion of colon carcinoma cells in vitro via interaction with CD44. *Cancer Res*, 2004b, 64, p. 4569-4576.
- Kim H, Kim YN, Kim H, *et al.* Oxidative stress attenuates Fas-mediated apoptosis in Jurkat T cell line through Bfl-1 induction. *Oncogene*, 2005, 24, p. 1252-1261.
- Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC, *et al.* Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol*, 2006, 8, p. 1348-1358.
- Kim JH, Sim SH, Ha HJ, *et al.* MCL-1ES, a novel variant of MCL-1, associates with MCL-1L and induces mitochondrial cell death. *FEBS Lett*, 2009a, 583, p. 2758-2764.
- Kim H, Tu HC, Ren D, *et al.* Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*, 2009b, 36, 487-499.
- Kim KW, Moretti L, Mitchell LR, *et al.* Combined Bcl-2/mammalian target of rapamycin inhibition leads to enhanced radiosensitization via induction of apoptosis and autophagy in non-small cell lung tumor xenograft model. *Clin Cancer Res*, 2009c, 15, p. 6096-6105.
- Kim YJ, Wilson DM. Overview of base excision repair biochemistry. *Curr Mol Pharmacol*, 2012, 5, p. 3-13.
- Kim JH, Bae J. MCL-1ES induces MCL-1L-dependent BAX- and BAK-independent mitochondrial apoptosis. *PLoS One*, 2013, 8, e79626.
- Kipps TJ, Eradat H, Grosicki S, *et al.* A phase 2 study of the BH3 mimetic BCL2 inhibitor navitoclax (ABT-263) with or without rituximab, in previously untreated B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 2015, 12, p. 1-8. [Epub ahead of print]
- Kitada S, Leone M, Sareth S, *et al.* Discovery, characterization, and structure-activity relationships studies of proapoptotic polyphenols targeting B-cell lymphocyte/leukemia-2 proteins. *J Med Chem*, 2003, 46, 4259-4264.
- Kitada S, Kress CL, Krajewska M, *et al.* Bcl-2 antagonist apogossypol (NSC736630) displays single-agent activity in Bcl-2-transgenic mice and has superior efficacy with less toxicity compared with gossypol (NSC19048). *Blood*, 2008, 111, p. 3211-3219.
- Klaus A, Birchmeier W. Wntsignalling and its impact on development and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2008, 8, p. 387-398.
- Klasa RJ, Gillum AM, Klem RE, *et al.* Oblimersen Bcl-2 antisense: facilitating apoptosis in anticancer treatment. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2002, 12, p. 193-213.

- Ko JK, Lee MJ, Cho SH, *et al.* Bfl-1S, a novel alternative splice variant of Bfl-1, localizes in the nucleus via its C-terminus and prevents cell death. *Oncogene*, 2003, 22, p. 2457-2465.
- Kobayashi S, Lee SH, Meng XW, *et al.* Serine 64 phosphorylation enhances the antiapoptotic function of Mcl-1. *J. Biol. Chem*, 2007, 282, p. 18407–18417.
- Koch U, Lehal R, Radtke F. Stem cells living with a Notch. *Development*, 2013, 140, p. 689-704.
- Kodama Y, Taura K, Miura K, *et al.* Antiapoptotic effect of c-Jun N-terminal Kinase-1 through Mcl-1 stabilization in TNF-induced hepatocyte apoptosis. *Gastroenterology*, 2009, 136, p. 1423-1434.
- Kohn AD, Moon RT. Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium*, 2005, 38, p. 439-446.
- Kokawa K, Shikone T, Otani T, *et al.* Transient increases of apoptosis and Bax expression occurring during radiotherapy in patients with invasive cervical carcinoma. *Cancer*, 1999, 86, p. 79-87.
- Konno Y, Dong P, Xiong Y, *et al.* MicroRNA-101 targets EZH2, MCL-1 and FOS to suppress proliferation, invasion and stem cell-like phenotype of aggressive endometrial cancer cells. *Oncotarget*, 2014, 5, p. 6049-6062.
- Konopleva M, Zhao S, Hu W, *et al.* The anti-apoptotic genes Bcl-X(L) and Bcl-2 are over-expressed and contribute to chemoresistance of non-proliferating leukaemic CD34+ cells. *Br J Haematol*, 2002, 118, p. 521–553.
- Konopleva M, Watt J, Contractor R, *et al.* Mechanisms of antileukemic activity of the novel Bcl-2 homology domain-3 mimetic GX15-070 (obatoclax). *Cancer Res*, 2008, 68, p. 3413-3420.
- Kontos CK, Christodoulou MI, Scorilas A. Apoptosis-related BCL2-family members: Key players in chemotherapy. *Anticancer Agents Med Chem*, 2014, 14, p. 353-374.
- Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, *et al.* Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol*, 1993, 4, p. 327-332.
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Tsakmaki V *et al.* Cancer stem cell phenotype relates to radio-chemotherapy outcome in locally advanced squamous cell head-neck cancer. *British Journal of cancer*, 2012, 106, p. 846-853.
- Kowaltowski AJ, Fiskum G. Redox mechanisms of cytoprotection by Bcl-2. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7, p. 508–514.
- Koybasi S, Senkal CE, Sundararaj K, *et al.* Defects in cell growth regulation by C18:0-ceramide and longevity assurance gene 1 in human head and neck squamous cell carcinomas. *J Biol Chem*, 2004, 279, p. 44311-44319.
- Krajewska M, Kitada S, Winter JN, *et al.* Bcl-B expression in human epithelial and nonepithelial malignancies. *Clin Cancer Res*, 2008, 14, p. 3011-3021.
- Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, *et al.* Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: Residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res*, 1993, 53, p. 4701–4714.

- Krishna S, Low IC, Pervaiz S. Regulation of mitochondrial metabolism: yet another facet in the biology of the oncoprotein Bcl-2. *Biochem J*, 2011, 435, p. 545-551.
- Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z, *et al.* Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature*, 2006, 442, p. 818-822.
- Krokan HE, Bjørås. Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5, a012583.
- Ku HH, Brunk UT, Sohal RS. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radic Biol Med*, 1993, 15, p. 621-627.
- Ku B, Liang C, Jung JU, *et al.* Evidence that inhibition of BAX activation by BCL-2 involves its tight and preferential interaction with the BH3 domain of BAX. *Cell Res*, 2011, 21, p. 627-641.
- Kucharczak JF, Simmons MJ, Duckett CS, *et al.* Constitutive proteasome-mediated turnover of Bfl-1/A1 and its processing in response to TNF receptor activation in FL5.12 pro-B cells convert it into a prodeath factor. *Cell Death Differ*, 2005, 12, p. 1225-1239.
- Kumar B, Cordell KG, Lee JS, *et al.* Response to therapy and outcomes in oropharyngeal cancer are associated with biomarkers including human papillomavirus, epidermal growth factor receptor, gender, and smoking. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2007, 69, 2 Suppl, p. 109-111.
- Kumar TS, Kari V, Choudhary B, *et al.* Anti-apoptotic protein BCL2 down-regulates DNA end joining in cancer cells. *J Biol Chem*, 2010, 285, p. 32657-32670.
- Kunkel TA, Erie DA. DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem*, 2005, 74, p. 681-710.
- Kuroda J, Puthalakath H, Cragg MS, *et al.* Bim and Bad mediate imatinib-induced killing of Bcr/Abl+ leukemic cells, and resistance due to their loss is overcome by a BH3 mimetic. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103, p. 14907-14912.
- Kurtz A, Oh S. Age related changes of the extracellular matrix and stem cell maintenance. *Prev Med*, 2012, 54, p. S50-S56
- Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, *et al.* BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell*, 2005, 17, p. 525-535.
- Kyrklund T. Two procedures to remove polar contaminants from a crude brain lipid extract by using prepacked reverse-phase columns. *Lipids*, 1987, 22, p. 274-277
- Labi V, Erlacher M, Kiessling S, *et al.* Loss of the BH3-only protein Bmf impairs B cell homeostasis and accelerates gamma irradiation-induced thymic lymphoma development. *J Exp Med*, 2008, 205, p. 641-655.
- Lam LT, Lu X, Zhang H, *et al.* A microRNA screen to identify modulators of sensitivity to BCL2 inhibitor ABT-263 (navitoclax). *Mol Cancer Ther*, 2010, 9, p. 2943-2950.
- Lanave C, Santamaria M, Saccone C. Comparative genomics: the evolutionary history of the Bcl-2 family. *Gene*, 2004, 333, p. 71-79.
- Lapham A, Adams JE, Paterson A, *et al.* The Bcl-w promoter is activated by beta-catenin/TCF4 in human colorectal carcinoma cells. *Gene*, 2009, 432, p. 112-117.

- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 1994, 367, p. 645-648.
- Le Gouill S, Podar K, Amiot M, *et al.* VEGF induces Mcl-1 up-regulation and protects multiple myeloma cells against apoptosis. *Blood*, 2004, 104, 2886-2892.
- Lee M, Hyun DH, Marshall KA, *et al.* Effect of overexpression of BCL-2 on cellular oxidative damage, nitric oxide production, antioxidant defenses, and the proteasome. *Free Radic Biol Med*, 2001, 31, p. 1550-1559.
- Lee HW, Lee SS, Lee SJ, *et al.* Bcl-w is expressed in a majority of infiltrative gastric adenocarcinomas and suppresses the cancer cell death by blocking stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase activation. *Cancer Res*, 2003, 63, p. 1093-1100.
- Lee TL, Yeh J, Van Waes C, *et al.* Epigenetic modification of SOCS-1 differentially regulates STAT3 activation in response to interleukin-6 receptor and epidermal growth factor receptor signaling through JAK and/or MEK in head and neck squamous cell carcinomas. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5, p. 8-19.
- Lee CF, Ling ZQ, Zhao T, *et al.* Genomic-wide analysis of lymphatic metastasis-associated genes in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2009, 15, p. 356-365.
- Lei K, Davis RJ. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100, p. 2432-2437.
- Leis O, Eguiara A, Lopez-Arribillaga E, *et al.* Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. *Oncogene*, 2012, 31, p. 1354-1365.
- Letai A, Bassik MC, Walensky LD, *et al.* Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 2002, 2, p. 183-192.
- Leung EL, Fiscus RR, Tung JW, *et al.* Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. *PLoS One*, 2010, 5, e14062.
- Lheureux S, N'Diaye M, Blanc-Fournier C, *et al.* Identification of predictive factors of response to the BH3-mimetic molecule ABT-737: an ex vivo experiment in human serous ovarian carcinoma. *Int J Cancer*, 2015, 136, E340-350.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, *et al.* Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 1998, 94, p. 491-501.
- Li YM, Wen Y, Zhou BP, *et al.* Enhancement of Bik antitumor effect by Bik mutants. *Cancer Res*, 2003, 63, p. 7630-7633.
- Li C, Wang X, Vais H, *et al.* Apoptosis regulation by Bcl-x(L) modulation of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel isoform gating. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104, p. 12565-12570.
- Li J, Viallet J, Haura EB. A small molecule pan-Bcl-2 family inhibitor, GX15-070, induces apoptosis and enhances cisplatin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008, 61, p. 525-534.
- Li R, Zang Y, Li C, *et al.* ABT-737 synergizes with chemotherapy to kill head and neck squamous cell carcinoma cells via a Noxa-mediated pathway. *Mol Pharmacol*, 2009, 75, p. 1231-1239.

- Li JY, Li YY, Jin W, *et al.* ABT-737 reverses the acquired radioresistance of breast cancer cells by targeting Bcl-2 and Bcl-xL. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012, 31, p. 102.
- Liao WC, Haimovitz-Friedman A, Persaud RS, *et al.* Ataxia telangiectasia-mutated gene product inhibits DNA damage-induced apoptosis via ceramide synthase. *J Biol Chem*, 1999, 274, p. 17908–17917.
- Liao WT, Ye YP, Zhang NJ, *et al.* MicroRNA-30b functions as a tumour suppressor in human colorectal cancer by targeting KRAS, PIK3CD and BCL2. *J Pathol*, 2014, 232, p. 415-427.
- Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79, p. 181-211.
- Lieber J, Kirchner B, Eicher C, *et al.* Inhibition of Bcl-2 and Bcl-X enhances chemotherapy sensitivity in hepatoblastoma cells. *Pediatr Blood Cancer*, 2010, 55, p. 1089-1095.
- Lieber J, Dewerth A, Wenz J, *et al.* Increased efficacy of CDDP in a xenograft model of hepatoblastoma using the apoptosis sensitizer ABT-737. *Oncol Rep*, 2013, 29, p. 646-652.
- Liew SH, Vaithyanathan K, Cook M, *et al.* Loss of the proapoptotic BH3-only protein BCL-2 modifying factor prolongs the fertile life span in female mice. *Biol Reprod*, 2014, 90, p. 77.
- Lin X, Morgan-Lappe S, Huang X, *et al.* 'Seed' analysis of off-target siRNAs reveals an essential role of Mcl-1 in resistance to the small-molecule Bcl-2/Bcl-XL inhibitor ABT-737. *Oncogene*, 2007, 26, p. 3972-3979.
- Linseman DA, Butts BD, Precht TA, *et al.* Glycogen synthase kinase-3 β phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J Neurosci*, 2004, 24, p. 9993–10002.
- Liu TX, Zhang JW, Tao J, *et al.* Gene expression networks underlying retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. *Blood*, 2000, 96, p. 1496–1504.
- Liu S, Kulp SK, Sugimoto Y, *et al.* The (-)-enantiomer of gossypol possesses higher anticancer potency than racemic gossypol in human breast cancer. *Anticancer Res*, 2002, 22, p. 33-38.
- Liu S, Dontu G, Mantle ID, *et al.* Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res*, 2006, 66, p. 6063–6071.
- Liu YL, Jiang SX, Yang YM, *et al.* USP22 acts as an oncogene by the activation of BMI-1-mediated INK4a/ARF pathway and Akt pathway. *Cell Biochem Biophys*, 2012, 62, p. 229-235.
- Liu Z, He H, Ding X, *et al.* SOD2 is a C-myc target gene that promotes the migration and invasion of tongue squamous cell carcinoma involving cancer stem-like cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 60, p. 139–146.
- Lo HW, Xia W, Wei Y, *et al.* Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Cancer Res*, 2005, 65, p. 338-348.
- Lomonosova E, Chinnadurai G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene*, 2008, 27, p. 2-19.
- Louie E, Nik S, Chen JS, *et al.* Identification of a stem-like cell population by exposing metastatic breast cancer cell lines to repetitive cycles of hypoxia and reoxygenation. *Breast Cancer Res*, 2010, 12, 94.

- Lovell JF, Billen LP, Bindner S, *et al.* Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell*, 2008, 135, p. 1074-1084.
- Low IC, Kang J, Pervaiz S. Bcl-2: a prime regulator of mitochondrial redox metabolism in cancer cells. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15, p. 2975-2987.
- Low IC, Loh T, Huang Y, *et al.* Ser70 phosphorylation of Bcl-2 by selective tyrosine nitration of PP2A-B56 δ stabilizes its antiapoptotic activity. *Blood*, 2014, 124, p. 2223-2234.
- Lowman XH, McDonnell MA, Kosloske A, *et al.* The proapoptotic function of Noxa in human leukemia cells is regulated by the kinase Cdk5 and by glucose. *Mol Cell*, 2010, 40, 823-833.
- Lui VWY, Hedberg ML, Li H, *et al.* Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer Discov*, 2013, 3, p. 761–769.
- Luo D, Cheng SC, Xie H, *et al.* Effects of Bcl-2 and Bcl-XL protein levels on chemoresistance of hepatoblastoma HepG2 cell line. *Biochem Cell Biol*, 2000, 78, p. 119-122
- Ma C, Ying C, Yuan Z, *et al.* dp5/HRK is a c-Jun target gene and required for apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *J Biol Chem*, 2007, 282, p. 30901-30909.
- Ma S, Lee TK, Zheng BJ, *et al.* CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene*, 2008, 27, p. 1749–1758.
- Ma J, Liu Y, Yang X, *et al.* Induction chemotherapy in patients with resectable head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *World J Surg Oncol*, 2013, 11, p. 67.
- Ma J, Wu Q, Zhang Y, *et al.* microRNA sponge blocks the tumor-suppressing functions of microRNA-122 in human hepatoma and osteosarcoma cells. *Oncol Rep*, 2014, 32, p. 2744-2752.
- Maalouf M, Alphonse G, Coliaux A, *et al.* Different mechanisms of cell death in radiosensitive and radioresistant p53 mutated head and neck squamous cell carcinoma cell lines exposed to carbon ions and x-rays. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009, 74, p. 200-209.
- Madjd Z, Mehrjerdi AZ, Sharifi AM, *et al.* CD44+ cancer cells express higher levels of the anti-apoptotic protein Bcl-2 in breast tumours. *Cancer Immun*, 2009, 9, p. 4.
- Mahdy AE, Cheng JC, Li J, *et al.* Acid ceramidase upregulation in prostate cancer cells confers resistance to radiation: AC inhibition, a potential radiosensitizer. *Mol Ther*, 2009, 17, p. 430–438.
- Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, *et al.* Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J*, 2007, 26, p. 2527-2539.
- Maji S, Samal SK, Pattanaik L, *et al.* Mcl-1 is an important therapeutic target for oral squamous cell carcinomas. *Oncotarget*, 2015.
- Major AG, Pitty LP, Farah CS. Cancer stem cell markers in head and neck squamous cell carcinoma. *Stem Cells Int*, 2013, 2013, p. 319489.
- Mak DH, Wang RY, Schober WD, *et al.* Activation of apoptosis signaling eliminates CD34+ progenitor cells in blast crisis CML independent of response to tyrosine kinase inhibitors. *Leukemia*, 2012, 26, p. 788-794.

- Mandon EC, Ehses I, Rother J, *et al.* Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver. *J Biol Chem*, 1992, 267, p. 11144–11148.
- Mani SA, Guo W, Liao MJ, *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 2008, 133, p. 704-715.
- Marcucci G, Byrd JC, Dai G, *et al.* Phase 1 and pharmacodynamic studies of G3139, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with chemotherapy in refractory or relapsed acute leukemia. *Blood*, 2003, 101, p. 425–432.
- Martínez-Senac M, Corbalán-García S, Gómez-Fernández JC. The structure of the C-terminal domain of the pro-apoptotic protein Bak and its interaction with model membranes. *Biophys J*, 2002, 82, p. 233-243.
- Martins RG, Parvathaneni U, Bauman JE, *et al.* Cisplatin and radiotherapy with or without erlotinib in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a randomized phase II trial. *J Clin Oncol*, 2013, 31, 11, p. 1415-1421.
- Maryanovich M, Oberkovitz G, Niv H, *et al.* The ATM-BID pathway regulates quiescence and survival of haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol*, 2012, 14, p. 535–541.
- Masui T, Ota I, Yook JI, *et al.* Snail-induced epithelial-mesenchymal transition promotes cancer stem cell-like phenotype in head and neck cancer cells. *Int J Oncol*, 2014, 44, p. 693-639.
- Mathai JP, Germain M, Marcellus RC, *et al.* Induction and endoplasmic reticulum location of BIK/NBK in response to apoptotic signaling by E1A and p53. *Oncogene*, 2002, 21, p. 2534-2544.
- Mathai JP, Germain M, Shore GC. BH3-only BIK regulates BAX,BAK-dependent release of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death. *J Biol Chem*, 2005, 280, p. 23829–23836.
- Matthews GM, Lefebure M, Doyle MA, *et al.* Preclinical screening of histone deacetylase inhibitors combined with ABT-737, rhTRAIL/MD5-1 or 5-azacytidine using syngeneic Vk*MYC multiple myeloma. *Cell Death Dis*, 2013, 4, e798.
- McLane JS, Rivet CJ, Gilbert RJ, *et al.* A biomaterial model of tumor stromal microenvironment promotes mesenchymal morphology but not epithelial to mesenchymal transition in epithelial cells. *Acta Biomater*, 2014, 10, p. 4811-4821.
- Mebratu YA, Dickey BF, Evans C, *et al.* The BH3-only protein Bik/Blk/Nbk inhibits nuclear translocation of activated ERK1/2 to mediate IFN γ -induced cell death. *J Cell Biol*, 2008, 183, p. 429-439.
- Meredith MJ, Cusick CL, Soltaninassab S *et al.* Expression of Bcl-2 increases intracellular glutathione by inhibiting methionine-dependent GSH efflux. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 248, p. 458–463.
- Mesicek J, Lee H, Feldman T, *et al.* Ceramide synthases 2, 5, and 6 confer distinct roles in radiation induced apoptosis in HeLa cells. *Cell Signal*, 2010, 22, p. 1300–1307.

- Mestre-Escorihuela C, Rubio-Moscardo F, Richter JA, *et al.* Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas. *Blood*, 2007, 109, p. 271-280.
- Michalak EM, Jansen ES, Haplo L, *et al.* Puma and to a lesser extent Noxa are suppressors of Myc-induced lymphomagenesis. *Cell Death Differ*, 2009, 16, p. 684-696.
- Michaud WA, Nichols AC, Mroz EA, *et al.* Bcl-2 blocks cisplatin-induced apoptosis and predicts poor outcome following chemoradiation treatment in advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2009, 15, p. 1645-1654.
- Michels J, O'Neill JW, Dallman CL, *et al.* Mcl-1 is required for Akata6 B-lymphoma cell survival and is converted to a cell death molecule by efficient caspase-mediated cleavage. *Oncogene*, 2004, 23, p. 4818-4827.
- Michels J, Obrist F, Vitale I, *et al.* MCL-1 dependency of cisplatin-resistant cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 2014, 92, p. 55-61.
- Minagawa N, Kruglov EA, Dranoff JA, *et al.* The anti-apoptotic protein Mcl-1 inhibits mitochondrial Ca^{2+} signals. *J Biol Chem*, 2005, 280, p. 3637-3644.
- Ming L, Sakaida T, Yue W, *et al.* Sp1 and p73 activate PUMA following serum starvation. *Carcinogenesis*, 2008, 29, p. 1878-1884.
- Mirkovic N, Voehringer DW, Story MD, *et al.* Resistance to radiation-induced apoptosis in Bcl-2-expressing cells is reversed by depleting cellular thiols. *Oncogene*, 1997, 15, p. 1461-1470.
- Mishina NM, Markvicheva KN, Bilan DS, *et al.* Visualization of intracellular hydrogen peroxide with HyPer, a genetically encoded fluorescent probe. *Methods Enzymol*, 2013, 526, p. 45-59.
- Mizoe JE, Hasegawa A, Jingu K, *et al.* Results of carbon ion radiotherapy for head and neck cancer. *Radiother Oncol*, 2012, 103, p. 32-37.
- Moitra K, Lou H, Dean M. Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development. *Clin Pharmacol Ther*, 2011, 89, p. 491-502.
- Moldoveanu T, Liu Q, Tocilj A, *et al.* The X-ray structure of a BAK homodimer reveals an inhibitory zinc binding site. *Mol Cell*, 2006, 24, p. 677-688.
- Moldoveanu T, Follis AV, Kriwacki RW, *et al.* Many players in BCL-2 family affairs. *Trends Biochem Sci*, 2014, 39, p. 101-111.
- Molitoris JK, McColl KS, Distelhorst CW. Glucocorticoid-mediated repression of the oncogenic microRNA cluster miR-17~92 contributes to the induction of Bim and initiation of apoptosis. *Mol Endocrinol*, 2011, 25, p. 409-420.
- Molofsky AV, Pardal R, Morrison SJ. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16, p. 700-707.
- Moncharmont C, Levy A, Gilormini M, *et al.* Targeting a cornerstone of radiation resistance: cancer stem cell. *Cancer Lett*, 2012, 322, p. 139-147.
- Monroe MM, Anderson EC, Clayburgh DR, *et al.* Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *J Oncol*, 2011, 2011, p. 762780.

- Morales AA, Olsson A, Celsing F, *et al.* Expression and transcriptional regulation of functionally distinct Bmf isoforms in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, 2004, 18, p. 41-47.
- Morales AA, Olsson A, Celsing F, *et al.* High expression of bfl-1 contributes to the apoptosis resistant phenotype in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer*, 2005, 113, p. 730-737.
- Morgan RK, Kingham PJ, Walsh MT, *et al.* Eosinophil adhesion to cholinergic IMR-32 cells protects against induced neuronal apoptosis. *J Immunol*, 2004, 173, p. 5963-5970.
- Morii T, Ohtsuka K, Ohnishi H, *et al.* BH3 mimetics inhibit growth of chondrosarcoma--a novel targeted-therapy for candidate models. *Anticancer Res*, 2014, 34, p. 6423-6430.
- Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*, 2006, 441, p. 1068-1074.
- Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*, 2008, 132, p. 598-611.
- Muchmore SW, Sattler M, Liang H, *et al.* X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*, 1996, 381, p. 335-341.
- Mukherjee N, Reuland SN, Lu Y, *et al.* Combining a BCL2 inhibitor with the retinoid derivative fenretinide targets melanoma cells including melanoma initiating cells. *J Invest Dermatol*, 2015, 135, p. 842-850.
- Mullen TD, Hannun, YA, Obeid LM. Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. *Biochem J*, 2012, 441, p. 789-802.
- Muñoz-Antonia T, Torrellas-Ruiz M, Clavell J, *et al.* Aberrant methylation inactivates transforming growth factor Beta receptor I in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Otolaryngol*, 2009, 2009, p. 848695.
- Murphy KL, Kittrell FS, Gay JP, *et al.* Bcl-2 expression delays mammary tumor development in dimethylbenz(a)anthracene-treated transgenic mice. *Oncogene*, 1999, 18, p. 6597-6604.
- Nagano O, Okazaki S, Saya H. Redox regulation in stem-like cancer cells by CD44 variant isoforms. *Oncogene*, 2013, 32, p. 5191-5198.
- Naik E, Michalak EM, Villunger A, *et al.* Ultraviolet radiation triggers apoptosis of fibroblasts and skin keratinocytes mainly via the BH3-only protein Noxa. *J Cell Biol*, 2007, 176, 415-424.
- Nakajima W, Hicks MA, Tanaka N, *et al.* Noxa determines localization and stability of MCL-1 and consequently ABT-737 sensitivity in small cell lung cancer. *Cell Death Dis*, 2014, 5, e1052.
- Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, 2001, 7, p. 683-694.
- Narita M, Nunez S, Heard E, *et al.* Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, 2003, 113, p. 703-716.
- Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, *et al.* Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol*, 2001, 153, p. 1265-1276.

- Nelson WG, Kastan MB. DNA strand-breaks – The DNA template Alterations that trigger p53-dependant DNA damage response pathways. *Mol Cell Biol*, 1994, 14, p. 1815-1823.
- Nelson-Rees WA, Daniels DW, Flandermeyer RR. Cross-contamination of cells in culture. *Science*, 1981, 212, p. 446-452.
- Nguyen M, Marcellus RC, Roulston A, *et al.* Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104, p. 19512-19517.
- Ni Z, Wang B, Dai X, *et al.* HCC cells with high levels of Bcl-2 are resistant to ABT-737 via activation of the ROS-JNK-autophagy pathway. *Free Radic Biol Med*, 2014, 70C, p. 194-203.
- Nikiforov MA, Riblett M, Tang WH, *et al.* Tumor cell-selective regulation of NOXA by c-MYC in response to proteasome inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104, p. 19488-19493.
- Nilsson I, Hoffmann I. Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog Cell Cycle Res*, 2000, 4, p. 107-114.
- Nishimoto A, Kugimiya N, Hosoyama T, *et al.* HIF-1 α activation under glucose deprivation plays a central role in the acquisition of anti-apoptosis in human colon cancer cells. *Int J Oncol*, 2014, 44, p. 2077-2084.
- Niu R, Yoshid M, Ling F. Increases in Mitochondrial DNA Content and 4977-bp Deletion upon ATM/Chk2 Checkpoint Activation in HeLa Cells. *PLoS One*, 2012, 7, e40572.
- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*, 2000, 24, p. 372-376.
- Nör JE, Christensen J, Mooney DJ, *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am J Pathol*, 1999, 154, p. 375–384.
- Nör JE, Christensen J, Liu J, *et al.* Up-regulation of Bcl-2 in microvascular endothelial cells enhances intratumoral angiogenesis and accelerates tumor growth. *Cancer Res*, 2001, 61, p. 2183–2188.
- Nör C, Zhang Z, Warner KA, *et al.* Cisplatin induces Bmi-1 and enhances the stem cell fraction in head and neck cancer. *Neoplasia*, 2014, 16, p. 137-146.
- Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 1976, 194, p. 23-28.
- O'Brien S, Moore JO, Boyd TE, *et al.* 5-year survival in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia in a randomized, phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen. *J Clin Oncol*, 2009a, 27, p. 5208-5212.
- O'Brien SM, Claxton DF, Crump M, *et al.* Phase I study of obatoclax mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2009b, 113, p. 299-305.
- O'Reilly LA, Cullen L, Visvader J, *et al.* The proapoptotic BH3-only protein bim is expressed in hematopoietic, epithelial, neuronal, and germ cells. *Am J Pathol*, 2000, 157, p. 449-461.

- O'Reilly LA, Print C, Hausmann G, *et al.* Tissue expression and subcellular localization of the pro-survival molecule Bcl-w. *Cell Death Differ*, 2001, 8, p. 486-494.
- Oakes SA, Scorrano L, Opferman JT, *et al.* Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102, p. 105-110.
- Oberstein A, Jeffrey PD, Shi Y. Crystal structure of the Bcl-xL-Bcl-2 peptide complex: Bcl-2 is a novel BH3-only protein. *J Biol Chem*, 2007, 282, p. 13123-13132.
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, *et al.* Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, 2000, 288, p. 1053-1058.
- Ohta S, Uemura H, Matsui Y, *et al.* Alterations of p16 and p14ARF genes and their 9p21 locus in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2009, 107, p. 81-91.
- Ohtani N, Yamakoshi K, Takahashi A, *et al.* The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J Med Invest*, 2004, 51, p. 146-153.
- Okami K, Wu L, Riggins G, *et al.* Analysis of PTEN/MMAC1 alterations in aerodigestive tract tumors. *Cancer Res*, 1998, 58, p. 509-511.
- Oki Y, Copeland A, Hagemeister F, *et al.* Experience with obatoclax mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist in patients with relapsed or refractory classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, 2012, 119, p. 2171-2172.
- Okumura K, Huang S, Sinicrope FA. Induction of Noxa sensitizes human colorectal cancer cells expressing Mcl-1 to the small-molecule Bcl-2/Bcl-xL inhibitor, ABT-737. *Clin Cancer Res*, 2008, 14, p. 8132-8142.
- Oliver CL, Bauer JA, Wolter KG, *et al.* In vitro effects of the BH3 mimetic, (-)-gossypol, on head and neck squamous cell carcinoma cells. *Clin Cancer Res*, 2004, 10, p. 7757-7763.
- Oliveira-Costa JP, Zanetti JS, Silveira GG, *et al.* Differential expression of HIF-1 α in CD44+CD24-/low breast ductal carcinomas. *Diagn Pathol*, 2011, 6, p. 73.
- Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, *et al.* An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*, 2005, 435, p. 677-681.
- Osman N, Elamin YY, Rafee S, *et al.* Weekly cisplatin concurrently with radiotherapy in head and neck squamous cell cancer: a retrospective analysis of a tertiary institute experience. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2013, 271, 8, p. 2253-2259.
- Pacey LK, Stead S, Gleave JA, *et al.* Neural Stem Cell Culture: Neurosphere generation, microscopical analysis and cryopreservation. *Protocol Exchange*, 2006.
- Paglin S, Hollister T, Delohery T, *et al.* A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res*, 2001, 61, p. 439-444.
- Paik PK, Rudin CM, Pietanza MC, *et al.* A phase II study of obatoclax mesylate, a Bcl-2 antagonist, plus topotecan in relapsed small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2011, 74, p. 481-485.

- Pajonk F, Vlashi E, McBride WH. Radiation resistance of cancer stem cells: the 4 R's of radiobiology revisited. *Stem Cells*, 2010, 28, p. 639-648.
- Palayoor ST, Macklis RM, Bump EA, *et al.* Modulation of radiation-induced apoptosis and G2/M block in murine T-lymphoma cells. *Radiat Res*, 1995, 141, p. 235-243.
- Pan R, Hogdal LJ, Benito JM, *et al.* Selective BCL-2 inhibition by ABT-199 causes on-target cell death in acute myeloid leukemia. *Cancer Discov*, 2014, 4, p. 362-375.
- Pang X, Zhang J, Lopez H, *et al.* The carboxyl-terminal tail of Noxa protein regulates the stability of Noxa and Mcl-1. *J Biol Chem*, 2014, 289, p. 17802-17811.
- Parikh SA, Kantarjian H, Schimmer A, *et al.* Phase II study of obatoclax mesylate (GX15-070), a small-molecule BCL-2 family antagonist, for patients with myelofibrosis. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2010, 10, p. 285-289.
- Park IC, Lee SH, Whang DY, *et al.* Expression of a novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, in various human cancers and cancer cell lines. *Anticancer Res*, 1997, 17, p. 4619-4622.
- Park IK, Qian D, Kiel M, *et al.* Bmi-1 is required for maintenance of adult self renewing haematopoietic stem cells. *Nature*, 2003, 423, p. 302-305.
- Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, *et al.* Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene*, 2006, 25, p. 1696-1708.
- Patel S, Rameshwar P. Tumorsphere Passage for Breast Cancer Stem Cells. Protocol Exchange. *Protocol Exchange*, 2013.
- Pattingre S, Tassa A, Qu X, *et al.* Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 2005, 122, p. 927-939.
- Pearson CG, Shikazono N, Thacker J, *et al.* Enhanced mutagenic potential of 8-oxo-7,8-dihydroguanine when present within a clustered DNA damage site. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32, p. 263-270.
- Pei N, Jie F, Luo J, *et al.* Gene expression profiling associated with angiotensin II type 2 receptor-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *PLoS One*, 2014, 9, e92253.
- Peinado H, Marin F, Cubillo E, *et al.* Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *J Cell Sci*, 2004, 117, p. 2827-2839.
- Peltonen JK, Vähäkangas KH, Helppi HM, *et al.* Specific TP53 mutations predict aggressive phenotype in head and neck squamous cell carcinoma: a retrospective archival study. *Head Neck Oncol*, 2011, 3, p. 20.
- Pereira CS, Oliveira MV, Fraga CA, *et al.* Impact of the epithelial dysplasia grading and Ki67 proliferation index in the adjacent non-malignant mucosa on recurrence and survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract*, 2012, 208, 11, p. 651-656.
- Perera MN, Lin SH, Peterson YK, *et al.* Bax and Bcl-xL exert their regulation on different sites of the ceramide channel. *Biochem J*, 2012, 445, p. 81-91.

- Pérez-Galán P, Roué G, Villamor N, *et al.* The BH3-mimetic GX15-070 synergizes with bortezomib in mantle cell lymphoma by enhancing Noxa-mediated activation of Bak. *Blood*, 2007, 109, p. 4441-4449.
- Pérez-Galán P, Roué G, López-Guerra M, *et al.* BCL-2 phosphorylation modulates sensitivity to the BH3 mimetic GX15-070 (Obatoclax) and reduces its synergistic interaction with bortezomib in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, 2008, 22, p. 1712-1720.
- Persano L, Rampazzo E, Della Puppa A, *et al.* The three-layer concentric model of glioblastoma: cancer stem cells, microenvironmental regulation, and therapeutic implications. *ScientificWorldJournal*, 2011, 11, p. 1829-1841.
- Pervaiz S, Clement MV. Superoxide anion: Oncogenic reactive oxygen species? *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39, p. 1297–1304.
- Petrocelli T, Poon R, Drucker DJ, *et al.* UVB radiation induces p21Cip1/WAF1 and mediates G1 and S phase checkpoints. *Oncogene*, 1996, 12, p. 1387-1396.
- Petros AM, Medek A, Nettesheim DG, *et al.* Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98, p. 3012–3017.
- Pettus BJ, Chalfant CE, Hannun YA. Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1585, p. 114-125.
- Pietrzak M, Puzianowska-Kuznicka M. p53-dependent repression of the human MCL-1 gene encoding an anti-apoptotic member of the BCL-2 family: the role of Sp1 and of basic transcription factor binding sites in the MCL-1 promoter. *Biol Chem*, 2008, 389, p. 383-393.
- Pignon JP, le Maître A, Maillard E, Bourhis J. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol*, 2009, 92, 1, p. 4-14.
- Pike LR, Phadwal K, Simon AK, *et al.* ATF4 orchestrates a program of BH3-only protein expression in severe hypoxia. *Mol Biol Rep*, 2012, 39, p. 10811-10822.
- Pinton P, Ferrari D, Magalhães P, *et al.* Reduced loading of intracellular Ca(2+) stores and downregulation of capacitative Ca(2+) influx in Bcl-2-overexpressing cells. *J Cell Biol*, 2000, 148, p. 857-862.
- Pinton P, Ferrari D, Rapizzi E, *et al.* The Ca²⁺ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *EMBO J*, 2001, 20, p. 2690–2701.
- van der Pluijm G. Epithelial plasticity, cancer stem cells and bone metastasis formation. *Bone*, 2011, 48, p. 37-43.
- Ploner C, Kofler R, Villunger A. Noxa: at the tip of the balance between life and death. *Oncogene*, 2008, 27, S84-92.
- Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, *et al.* TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, 2007, 357, p. :2552-2561.

- Pojo M, Gonçalves CS, Xavier-Magalhães A, *et al.* A transcriptomic signature mediated by HOXA9 promotes human glioblastoma initiation, aggressiveness and resistance to temozolomide. *Oncotarget*, 2015, 6, p. 7657-7674.
- Pollack A, Cowen D, Troncoso P, *et al.* Molecular markers of outcome after radiotherapy in patients with prostate carcinoma: Ki-67, bcl-2, bax, and bcl-x. *Cancer*, 2003, 97, p. 1630-1638.
- Portier BP, Taglialatela G. Bcl-2 Localized the Nuclear Compartment Induces Apoptosis after Transient Overexpression. *J Biol Chem*, 2006, 281, p. 40493-40502.
- Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, *et al.* Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104, p. 973-978.
- Print CG, Loveland KL, Gibson L, *et al.* Apoptosis regulator Bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, p. 12424-12431.
- Psyri A, Yu Z, Weinberger PM, *et al.* Quantitative determination of nuclear and cytoplasmic epidermal growth factor receptor expression in oropharyngeal squamous cell cancer by using automated quantitative analysis. *Clin Cancer Res*, 2005, 11, p. 5856-5862.
- Putchá GV, Le S, Frank S, *et al.* JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron*, 2003, 38, p. 899-914.
- Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, *et al.* The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell*, 1999, 3, p. 287-296.
- Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, *et al.* Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science*, 2001, 293, p. 1829-1832.
- Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, *et al.* ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*, 2007, 129, p. 1337-1349.
- Puthier D, Bataille R, Amiot M. IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK / STAT rather than ras / MAP kinase pathway. *Eur J Immunol*, 1999, 29, p. 3945-3950.
- Qian J, Zou Y, Rahman JS, *et al.* Synergy between phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and Bcl-xL in the control of apoptosis in adenocarcinoma cells of the lung. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8, p. 101-109.
- Qian X, Wagner S, Ma C, *et al.* Prognostic significance of ALDH1A1-positive cancer stem cells in patients with locally advanced, metastasized head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014, 140, p. 1151-1158.
- Qiao B, Chen Z, Hu F, *et al.* BMI-1 activation is crucial in hTERT-induced epithelial-mesenchymal transition of oral epithelial cells. *Exp Mol Pathol*, 2013, 95, p. 57-61.
- Qin H, Luo J, Zhu YP, *et al.* Combination of taxanes, cisplatin and fluorouracil as induction chemotherapy for locally advanced head and neck cancer: a meta-analysis. *PLoS One*, 2012, 7, 12, p. 51526.

- Qiu W, Schönleben F, Li X, Su GH. Disruption of transforming growth factor beta-Smad signaling pathway in head and neck squamous cell carcinoma as evidenced by mutations of SMAD2 and SMAD4. *Cancer Let*, 2007, 245, p. 163-170.
- Raats DA, de Bruijn MT, Steller EJ, *et al.* Synergistic killing of colorectal cancer cells by oxaliplatin and ABT-737. *Cell Oncol*, 2011, 34, p. 307-313.
- Ramjaun AR, Tomlinson S, Eddaoudi A, *et al.* Upregulation of two BH3-only proteins, Bmf and Bim, during TGF beta-induced apoptosis. *Oncogene*, 2007, 26, p. 970-981.
- Rasooly R, Schuster GU, Gregg JP, *et al.* Retinoid x receptor agonists increase bcl2a1 expression and decrease apoptosis of naive T lymphocytes. *J Immunol*, 2005, 175, p. 7916–7929.
- Rautureau GJ, Day CL, Hinds MG. Intrinsically disordered proteins in bcl-2 regulated apoptosis. *Int J Mol Sci*, 2010, 11, p. 1808-1824.
- Rautureau GJ, Yabal M, Yang H, *et al.* The restricted binding repertoire of Bcl-B leaves Bim as the universal BH3-only prosurvival Bcl-2 protein antagonist. *Cell Death Dis*, 2012, 3, e443.
- Ray RM, Bhattacharya S, Johnson LR. Mdm2 inhibition induces apoptosis in p53 deficient human colon cancer cells by activating p73- and E2F1-mediated expression of PUMA and Siva-1. *Apoptosis*, 2011, 16, p. 35-44.
- Ready N, Karaseva NA, Orlov SV, *et al.* Double-blind, placebo-controlled, randomized phase 2 study of the proapoptotic agent AT-101 plus docetaxel, in second-line non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 2011, 6, p. 781-785.
- Real PJ, Sanz C, Gutierrez O, *et al.* Transcriptional activation of the proapoptotic bik gene by E2F proteins in cancer cells. *FEBS Lett*, 2006, 580, p. 5905-5909.
- Reed AL, Califano J, Cairns P, *et al.* High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 1996, 56, p. 3630-3633.
- Reddy BK, Lokesh V, Vidyasagar MS, *et al.* Nimotuzumab provides survival benefit to patients with inoperable advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: A randomized, open-label, phase IIb, 5-year study in Indian patients. *Oral Oncol*, 2011, Epub.
- Ren D, Tu HC, Kim H, *et al.* BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK dependent cell death program. *Science*, 2010, 330, p. 1390-1393.
- Reuland SN, Goldstein NB, Partyka KA, *et al.* The combination of BH3-mimetic ABT-737 with the alkylating agent temozolomide induces strong synergistic killing of melanoma cells independent of p53. *PLoS One*, 2011, 6, e24294.
- Reuland SN, Goldstein NB, Partyka KA, *et al.* ABT-737 synergizes with Bortezomib to kill melanoma cells. *Biol Open*, 2012, 1, p. 92-100.
- Reynolds CP, Maurer BJ, Kolesnick RN. Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy. *Cancer Lett*, 2004, 206, p. 169-180.

- Riker AI, Enkemann SA, Fodstad O, *et al.* The gene expression profiles of primary and metastatic melanoma yields a transition point of tumor progression and metastasis. *BMC Med Genomics*, 2008, 1, p. 13.
- Robert G, Gastaldi C, Puissant A, *et al.* The anti-apoptotic Bcl-B protein inhibits BECN1-dependent autophagic cell death. *Autophagy*, 2012, 8, p. 637-649.
- Robles AI, Bemmels NA, Foraker AB, *et al.* APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Res*, 2001, 61, p. 6660-6664.
- Rodriguez JM, Glozak MA, Ma Y, *et al.* Bok, Bcl-2-related Ovarian Killer, Is Cell Cycle-regulated and Sensitizes to Stress-induced Apoptosis. *J Biol Chem*, 2006, 281, p. 22729-22735.
- Rodriguez CP, Adelstein DJ, Rybicki LA, *et al.* Single-arm phase II study of multiagent concurrent chemoradiotherapy and gefitinib in locoregionally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck*, 2012, 34, 11, p. 1517-1523.
- Rodriguez-Lafrasse C, Alphonse G, Aloy MT, *et al.* Increasing endogenous ceramide using inhibitors of sphingolipid metabolism aximizes ionizing radiation-induced mitochondrial injury and apoptotic cell killing. *Int J Cancer*, 2002, 101, p. 589-598.
- Rohatgi R, Milenkovic L, Scott MP. Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science*, 2007, 317, p. 372-376.
- Rohwer N, Cramer T. Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist Updat*, 2011, 14, p. 191-201.
- Rooswinkel RW, van de Kooij B, Verheij M, *et al.* Bcl-2 is a better ABT-737 target than Bcl-xL or Bcl-w and only Noxa overcomes resistance mediated by Mcl-1, Bfl-1, or Bcl-B. *Cell Death Dis*, 2012, 3, e366.
- Routray S, Mohanty N. Cancer stem cells accountability in progression of head and neck squamous cell carcinoma: the most recent trends! *Mol Biol Int*, 2014, 2014, p. 375325.
- Rudin CM, Salgia R, Wang X, *et al.* Randomized phase II Study of carboplatin and etoposide with or without the bcl-2 antisense oligonucleotide oblimersen for extensive-stage small-cell lung cancer: CALGB 30103. *J Clin Oncol*, 2008, 26, p. 870-876.
- Rudin CM, Hann CL, Garon EB, *et al.* Phase II study of single-agent navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2012, 18, p. 3163-3169.
- Ruvolo PP, Clark W, Mumby M, *et al.* A functional role for the B56 alpha-subunit of protein phosphatase 2A in ceramide-mediated regulation of Bcl2 phosphorylation status and function. *J Biol Chem*, 2002, 277, p. 22847-22852.
- Ryu Y, Hall CP, Reynolds CP, *et al.* Caspase-dependent Mcl-1 cleavage and effect of Mcl-1 phosphorylation in ABT-737-induced apoptosis in human acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Exp Biol Med*, 2014, 239, p. 1390-1402.
- Sabin RJ, Anderson RM. Cellular Senescence - its role in cancer and the response to ionizing radiation. *Genome Integr*, 2011, 2, p. 7.

- Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T. Sox4 functions as a positive regulator of beta-catenin signaling through upregulation of TCF4 during morular differentiation of endometrial carcinomas. *Laboratory Investigation*, 2012, 92, p. 511–521.
- Salama JK, Haraf DJ, Stenson KM, *et al.* A randomized phase II study of 5-fluorouracil, hydroxyurea, and twice-daily radiotherapy compared with bevacizumab plus 5-fluorouracil, hydroxyurea, and twice-daily radiotherapy for intermediate-stage and T4N0-1 head and neck cancers. *Ann Oncol*, 2011, 22, 10, p. 2304-2309.
- Saleh A, Zain RB, Hussaini H, *et al.* Transcriptional profiling of oral squamous cell carcinoma using formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Oral Oncol*, 2010, 46, p. 379-386.
- San Filippo J, Sung P, Klein H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem*, 2008, 77, p. 229-257.
- Santana P, Pena LA, Haimovitz-Friedman A, *et al.* Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell*, 1996, 86, p. 189–199.
- Sarosiek KA., Chi X, Bachman JA, *et al.* BID preferentially activates BAK while BIM preferentially activates BAX, affecting chemotherapy response. *Mol Cell*, 2013, 51, p. 751-765.
- Sawada M, Nakashima S, Banno Y, *et al.* Influence of Bax or Bcl-2 overexpression on the ceramide-dependent apoptotic pathway in glioma cells. *Oncogene*, 2000, 19, p. 3508-3520.
- Sayed SI, Dwivedi RC, Katna R, *et al.* Implications of understanding cancer stem cell (CSC) biology in head and neck squamous cell cancer. *Oral Oncol*, 2011, 47, p. 237-243.
- Scheel C, Weinberg RA. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22, p. 396-403.
- Scheid MP, Schubert KM, Duronio V. Regulation of bad phosphorylation and association with Bcl-x(L) by the MAPK/Erk kinase. *J Biol Chem*, 1999, 274, p. 31108-31113.
- Schepers AG, Snippert HJ, Stange DE, *et al.* Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science*, 2012, 337, p. 730-735.
- Schilling J, Schöppe J, Sauer E, *et al.* Co-crystallization with conformation-specific designed ankyrin repeat proteins explains the conformational flexibility of BCL-W. *J Mol Biol*, 2014, 426, p. 2346-2362.
- Schimmer AD, O'Brien S, Kantarjian H, *et al.* A phase I study of the pan bcl-2 family inhibitor obatoclax mesylate in patients with advanced hematologic malignancies. *Clin Cancer Res*, 2008, 14, p. 8295-8301.
- Schimmer AD, Raza A, Carter TH, *et al.* A multicenter phase I/II study of obatoclax mesylate administered as a 3- or 24-hour infusion in older patients with previously untreated acute myeloid leukemia. *PLoS One*, 2014, 9, e108694.
- Schmelzle T, Mailloux AA, Overholtzer M, *et al.* Functional role and oncogene-regulated expression of the BH3-only factor Bmf in mammary epithelial anoikis and morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104, p. 3787-3792.

- Schoenwaelder SM, Jarman KE, Gardiner EE, *et al.* Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetics can induce a transient thrombocytopathy that undermines the hemostatic function of platelets. *Blood*, 2011, 118, p. 1663-1674.
- Schoenwaelder SM, Jackson SP. Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetics (ABT-737 or ABT-263) and the modulation of cytosolic calcium flux and platelet function. *Blood*, 2012, 119, p. 1320-1321.
- Schuler M, Maurer U, Goldstein JC, *et al.* p53 triggers apoptosis in oncogene-expressing fibroblasts by the induction of Noxa and mitochondrial Bax translocation. *Cell Death Differ*, 2003, 10, p. 451-460.
- Schulman JJ, Wright FA, Kaufmann T, *et al.* The Bcl-2 protein family member Bok binds to the coupling domain of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and protects them from proteolytic cleavage. *J Biol Chem*, 2013, 288, p. 25340-25349.
- Schulte G. Frizzleds and WNT/ β -catenin signaling - The black box of ligand-receptor selectivity, complex stoichiometry and activation kinetics. *Eur J Pharmacol*, 2015, 2999, p. 30015-30017.
- Schwickart M, Huang X, Lill JR, *et al.* Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature*, 2010, 463, p. 103-107.
- Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, *et al.* BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} : a control point for apoptosis. *Science*, 2003, 300, p. 135-139.
- Seidel S, Garvalov BK, Wirta V, *et al.* A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain*, 2010, 133, p. 983-995.
- Senkal CE, Ponnusamy S, Bielawski J, *et al.* Antiapoptotic roles of ceramide-synthase-6-generated C16-ceramide viaselective regulation of the ATF6/CHOP arm of ER-stress-response pathways. *FASEB J*, 2010, 24, p. 296-308.
- Serizawa H, Mäkelä TP, Conaway JW, *et al.* Association of Cdk-activating kinase subunits with transcription factor TFIIH. *Nature*, 1995, 374, p. 280-282.
- Sesto A, Navarro M, Burslem F, *et al.* Analysis of the ultraviolet B response in primary human keratinocytes using oligonucleotide microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99, p. 2965-2970.
- Setoguchi K, Otera H, Mihara K. Cytosolic factor- and TOM-independent import of C-tail-anchored mitochondrial outer membrane proteins. *EMBO J*, 2006, 25, p. 5635-5647.
- Séveno C, Loussouarn D, Bréchet S, *et al.* γ -Secretase inhibition promotes cell death, Noxa upregulation, and sensitization to BH3 mimetic ABT-737 in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res*, 2012, 14, R96.
- Sexl V, Diehl JA, Sherr CJ, *et al.* A rate limiting function of cdc25A for S phase entry inversely correlates with tyrosine dephosphorylation of Cdk2. *Oncogene*, 1999, 18, p. 573-582.
- Shamas-Din A, Bindner S, Zhu W, *et al.* tBid undergoes multiple conformational changes at the membrane required for Bax activation. *J Biol Chem*, 2013, 288, p. 22111-22127.
- Shao Y, Aplin AE. ERK2 phosphorylation of serine 77 regulates Bmf pro-apoptotic activity. *Cell Death Dis*, 2012, 3, e253.

Shapiro GI, Edwards CD, Ewen ME, *et al.* p16INK4A participates in a G1 arrest checkpoint in response to DNA damage. *Mol Cell Biol*, 1998, 18, p.378-387.

Sharma H, Sen S, Mathur M, *et al.* Combined evaluation of expression of telomerase, survivin, and anti-apoptotic Bcl-2 family members in relation to loss of differentiation and apoptosis in human head and neck cancers. *Head Neck*, 2004, 26, p. 733-740.

Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, *et al.* CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res*, 2006, 8, R59.

Shibue T, Takeda K, Oda E, *et al.* Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. *Genes Dev*, 2003, 17, p. 2233-2238.

Shimazu T, Degenhardt K, Nur-E-Kamal A, *et al.* NBK/BIK antagonizes MCL-1 and BCL-XL and activates BAK-mediated apoptosis in response to protein synthesis inhibition. *Genes Dev*, 2007, 21, p. 929-941.

Shore GC, Viallet J. Modulating the bcl-2 family of apoptosis suppressors for potential therapeutic benefit in cancer. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2005, p. 226-230.

Show MD, Hill CM, Anway MD, *et al.* Phosphorylation of mitogen-activated protein kinase 8 (MAPK8) is associated with germ cell apoptosis and redistribution of the Bcl2-modifying factor (BMF). *J Androl*, 2008, 29, p. 338–344.

Sillanpää S, Anttila MA, Voutilainen K, *et al.* CD44 expression indicates favorable prognosis in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 2003, 9, p. 5318-5324.

Simmons MJ, Fan G, Zong WX, *et al.* Bfl-1/A1 functions, similar to Mcl-1, as a selective tBid and Bak antagonist. *Oncogene*, 2008, 27, p. 1421-1428.

Simonin K, N'Diaye M, Lheureux S, *et al.* Platinum compounds sensitize ovarian carcinoma cells to ABT-737 by modulation of the Mcl-1/Noxa axis. *Apoptosis*, 2013, 18, p. 492-508.

Simpson LA, Burwell EA, Thompson KA, *et al.* The antiapoptotic gene A1/BFL1 is a WT1 target gene that mediates granulocytic differentiation and resistance to chemotherapy. *Blood*, 2006, 107, p. 4695–4702.

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 2003, 63, p. 5821-5828.

Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, 2010, 29, p. 4741-4751.

Siskind LJ, Feinstein L, Yu T, *et al.* Anti-apoptotic Bcl-2 Family Proteins Disassemble Ceramide Channels. *J Biol Chem*, 2008, 283, p. 6622-6630.

Siskind LJ, Mullen TD, Romero Rosales K, *et al.* The BCL-2 protein BAK is required for long-chain ceramide generation during apoptosis. *J Biol Chem*, 2010, 285, p. 11818-11826.

Skvara H, Thallinger C, Wacheck V, *et al.* Mcl-1 blocks radiation-induced apoptosis and inhibits clonogenic cell death. *Anticancer Res*, 2005, p. 2697-2703.

- Smeets SJ, Braakhuis BJ, Abbas S, *et al.* Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus. *Oncogene*, 2006, 25, p. 2558-2564.
- Smith EM, Rubenstein LM, Hoffman H, *et al.* Human papillomavirus, p16 and p53 expression associated with survival of head and neck cancer. *Infect Agent Cancer*, 2010, 5, p. 4.
- Sok JC, Coppelli FM, Thomas SM, *et al.* Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin Cancer Res*, 2006, 12, p. 5064-5073.
- Song J, Chang I, Chen Z, *et al.* Characterization of side populations in HNSCC: highly invasive, chemoresistant and abnormal Wnt signaling. *PLoS One*, 2010, 5, e11456.
- Song T, Chai G, Liu Y, *et al.* Mechanism of synergy of BH3 mimetics and paclitaxel in chronic myeloid leukemia cells: Mcl-1 inhibition. *Eur J Pharm Sci*, 2015, 70, p. 64-71.
- Sonpavde G, Matveev V, Burke JM, *et al.* Randomized phase II trial of docetaxel plus prednisone in combination with placebo or AT-101, an oral small molecule Bcl-2 family antagonist, as first-line therapy for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Ann Oncol*, 2012, 23, p. 1803-1808.
- Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, *et al.* ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med*, 2013, 19, p. 202-208.
- Squarize CH, Castilho RM, Abrahao AC, *et al.* PTEN deficiency contributes to the development and progression of head and neck cancer. *Neoplasia*, 2013, 15, p. 461-471.
- Staibano S, Merolla F, Testa D, *et al.* OPN/CD44v6 overexpression in laryngeal dysplasia and correlation with clinical outcome. *Br J Cancer*, 2007, 97, p. 1545-1551.
- Stamelos VA, Redman CW, Richardson A. Understanding sensitivity to BH3 mimetics: ABT-737 as a case study to foresee the complexities of personalized medicine. *J Mol Signal*. 2012, 7, p. 12.
- Steckley D, Karajgikar M, Dale LB, *et al.* Puma is a dominant regulator of oxidative stress induced Bax activation and neuronal apoptosis. *J Neurosci*, 2007, 27, p. 12989-12999.
- Steel G, Peckham MG. Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1979, 5, p. 85-93.
- Strasser-Wozak EM, Hartmann BL, Geley S, *et al.* Irradiation induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in p53-deficient lymphoblastic leukemia cells without affecting Bcl-2 and Bax expression. *Cell Death Differ*, 1998, 5, p. 687-693.
- Sugio A, Iwasaki M, Habata S, *et al.* BAG3 upregulates Mcl-1 through downregulation of miR-29b to induce anticancer drug resistance in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2014, 134, p. 615-623.
- Sun Q, Sakaida T, Yue W, *et al.* Chemosensitization of head and neck cancer cells by PUMA. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6, p. 3180-3188.
- Sun Y, Wu J, Aboukameel A, *et al.* Apogossypolone, a nonpeptidic small molecule inhibitor targeting Bcl-2 family proteins, effectively inhibits growth of diffuse large cell lymphoma cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7, p. 1418-1426.

- Sun XP, Zhang X, He C, *et al.* ABT-737 synergizes with arsenic trioxide to induce apoptosis of gastric carcinoma cells in vitro and in vivo. *J Int Med Res*, 2012, 40, p. 1251-1264.
- Sun Y, Ponz-Sarvisé M, Chang SS, *et al.* Proteasome inhibition enhances the killing effect of BikDD gene therapy. *Am J Transl Res*, 2015, 7, p. 319-327.
- Sutherland BM, Bennett PV, Schenk H, *et al.* Clustered DNA damages induced by high and low LET radiation, including heavy ions. *Phys Med*, 2001, 17, 202-204.
- Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*, 2000, 103, p. 645-654.
- Szabadkai G, Bianchi K, Varnai P, *et al.* Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca^{2+} channels. *J Cell Biol*, 2006, 175, p. 901-911.
- Tabor MH, Clay MR, Owen JH, *et al.* Head and neck cancer stem cells: the side population. *Laryngoscope*, 2011, 121, p. 527-533.
- Tagawa H, Karnan S, Suzuki R, *et al.* Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene*, 2005, 24, p. 1348-1358.
- Tagscherer KE, Fassl A, Campos B, *et al.* Apoptosis-based treatment of glioblastomas with ABT-737, a novel small molecule inhibitor of Bcl-2 family proteins. *Oncogene*, 2008, 27, p. 6646-6656.
- Tagscherer KE, Fassl A, Sinkovic T, *et al.* p53-dependent regulation of Mcl-1 contributes to synergistic cell death by ionizing radiation and the Bcl-2/Bcl-XL inhibitor ABT-737. *Apoptosis*, 2012, 17, p. 187-199.
- Tahir SK, Yang X, Anderson MG, *et al.* Influence of Bcl-2 family members on the cellular response of small-cell lung cancer cell lines to ABT-737. *Cancer Res*, 2007, 67, p. 1176-1183.
- Takaoka A, Adachi M, Okuda H, *et al.* Anti-cell death activity promotes pulmonary metastasis of melanoma cells. *Oncogene*, 1997, 14, p. 2971-2977.
- Tamaki H, Harashima N, Hiraki M, *et al.* Bcl-2 family inhibition sensitizes human prostate cancer cells to docetaxel and promotes unexpected apoptosis under caspase-9 inhibition. *Oncotarget*, 2014, 5, p. 11399-113412.
- Terradillos O, Montessuit S, Huang DC, *et al.* Direct addition of BimL to mitochondria does not lead to cytochrome c release. *FEBS Lett*, 2002, 522, p. 29-34.
- Thomadaki H, Scorilas A. Molecular profile of the BCL2 family of the apoptosis related genes in breast cancer cells after treatment with cytotoxic/cytostatic drugs. *Connect Tissue Res*, 2008, 49, p. 261-264.
- Tianhu Z, Shiguang Z, Xinghan L. Bmf is upregulated by PS-341-mediated cell death of glioma cells through JNK phosphorylation. *Mol Biol Rep*, 2010, 37, p. 1211-1219.
- Tirino V, Desiderio V, d'Aquino R, *et al.* Detection and characterization of CD133+ cancer stem cells in human solid tumours. *PLoS One*, 2008, 3, e3469.

- Tolcher AW, Kuhn J, Schwartz G, *et al.* A Phase I pharmacokinetic and biological correlative study of oblimersen sodium (genasense, g3139), an antisense oligonucleotide to the bcl-2 mRNA, and of docetaxel in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 2004, 10, p. 5048–5057.
- Touzeau C, Dousset C, Bodet L, *et al.* ABT-737 induces apoptosis in mantle cell lymphoma cells with a Bcl-2high/Mcl-1low profile and synergizes with other antineoplastic agents. *Clin Cancer Res*, 2011, 17, p. 5973-5981.
- Tran NL, McDonough WS, Savitch BA, *et al.* The tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)-fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14) signaling system regulates glioma cell survival via NFkappaB pathway activation and BCL-XL/BCL-W expression. *J Biol Chem*, 2005, 280, p. 3483-3492.
- Tran VH, Bartolo R, Westphal D, *et al.* Bak apoptotic function is not directly regulated by phosphorylation. *Cell Death Dis*, 2013, 4, e452.
- Trask DK, Wolf GT, Bradford CR, *et al.* Expression of Bcl-2 family proteins in advanced laryngeal squamous cell carcinoma: correlation with response to chemotherapy and organ preservation. *Laryngoscope*, 2002, 112, p. 638-644.
- Tremblais K, Oliver L, Juin P, *et al.* The C-terminus of bax is not a membrane addressing/anchoring signal. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 260, p. 582–591.
- Trisciuglio D, Desideri M, Ciuffreda L, *et al.* Bcl-2 overexpression in melanoma cells increases tumor progression-associated properties and in vivo tumor growth. *J Cell Physiol*, 2005, 205, p. 414-421.
- Trisciuglio D, Gabellini C, Desideri M, *et al.* Bcl-2 regulates HIF-1alpha protein stabilization in hypoxic melanoma cells via the molecular chaperone HSP90. *PLoS One*, 2010, 5, e11772.
- Trisciuglio D, De Luca T, Desideri M, *et al.* Removal of the BH4 domain from Bcl-2 protein triggers an autophagic process that impairs tumor growth. *Neoplasia*, 2013, 15, p. 315-327.
- Tromp JM, Geest CR, Breij EC, *et al.* Tipping the Noxa/Mcl-1 balance overcomes ABT-737 resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*, 2012, 18, p. 487-498.
- Trudel S, Li ZH, Rauw J, *et al.* Preclinical studies of the pan-Bcl inhibitor obatoclax (GX015-070) in multiple myeloma. *Blood*, 2007, 109, p. 5430-5438.
- Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, *et al.* ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res*, 2008, 68, p. 3421-3428.
- Tsiftoglou AS, Bonovolias ID, Tsiftoglou SA. Multilevel targeting of hematopoietic stem cell self-renewal, differentiation and apoptosis for leukemia therapy. *Pharmacol Ther*, 2009, 122, p. 264-280.
- Tvrđík D, Skálová H, Dunder P, *et al.* Apoptosis - associated genes and their role in predicting responses to neoadjuvant breast cancer treatment. *Med Sci Monit*, 2012, 18, p. 60-67.
- Tzung SP, Kim KM, Basañez G, *et al.* Antimycin A mimics a cell-death-inducing Bcl-2 homology domain 3. *Nat Cell Biol*, 2001, 3, p. 183-191.
- Uchino M, Kojima H, Wada K, *et al.* Nuclear beta-catenin and CD44 upregulation characterize invasive cell populations in non-aggressive MCF-7 breast cancer cells. *BMC Cancer*, 2010, 10, 414.

Ulrich-Pur H, Erovic BM, Soleiman A, *et al.* Changes in Mcl-1 expression in rectal cancer in relation to neo-adjuvant radiotherapy. *Wien Klin Wochenschr*, 2005, 117, p. 136-140.

Upton JP, Austgen K, Nishino M, *et al.* Caspase-2 cleavage of BID is a critical apoptotic signal downstream of endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*, 2008, 28, p. 3943-3951.

Vairo G, Soos TJ, Upton TM, *et al.* Bcl-2 retards cell cycle entry through p27(Kip1), pRB relative p130, and altered E2F regulation. *Mol Cell Biol*, 2000, 20, 4745-4753.

Vail ME, Chaisson ML, Thompson J, *et al.* Bcl-2 expression delays hepatocyte cell cycle progression during liver regeneration. *Oncogene*, 2002, 21, p. 1548-1555.

Vaillant F, Merino D, Lee L, *et al.* Targeting BCL-2 with the BH3 mimetic ABT-199 in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Cell*, 2013, 24, p. 120-129.

Van de Kooij B, Rooswinkel RW, Kok F, *et al.* Polyubiquitination and proteasomal turnover controls the anti-apoptotic activity of Bcl-B. *Oncogene*, 2013, 32, p. 5439-5448.

Van Poznak C, Seidman AD, Reidenberg MM, *et al.* Oral gossypol in the treatment of patients with refractory metastatic breast cancer: a phase I/II clinical trial. *Breast Cancer Res Treat*, 2001, 66, p. 239-248.

Vance JE. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J Biol Chem*, 1990, 265, p. 7248-7256.

Vandenberg CJ, Cory S. ABT-199, a new Bcl-2-specific BH3 mimetic, has in vivo efficacy against aggressive Myc-driven mouse lymphomas without provoking thrombocytopenia. *Blood*, 2013, 121, p. 2285-2288.

Velaithan R, Kang J, Hirpara JL, *et al.* The small GTPase Rac1 is a novel binding partner of Bcl-2 and stabilizes its antiapoptotic activity. *Blood*, 2011, 117, p. 6214-6226.

Ventura A, Young AG, Winslow MM, *et al.* Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell*, 2008, 132, p. 875-886.

Verbakel WF, Cuijpers JP, Hoffmans D, *et al.* Volumetric intensity-modulated arc therapy vs. conventional IMRT in head-and-neck cancer: a comparative planning and dosimetric study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009, 74, 1, p. 252-259.

Verma S, Zhao LJ, Chinnadurai G. Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BIK: mapping of phosphorylation sites and effect on apoptosis. *J Biol Chem*, 2001, 276, p. 4671-4676.

Vermorken JB, Remenar E, van Herpen C, *et al.* Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. *N Engl J Med*, 2007, 357, 17, p. 1695-1704.

Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, *et al.* Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med*, 2008, 359, p. 1116-1127.

Vermorken JB, Stöhlmacher-Williams J, Davidenko I, *et al.* Cisplatin and fluorouracil with or without panitumumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck (SPECTRUM): an open-label phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol*, 2013, 14, 8, p. 697-710.

- Vlahovic G, Karantza V, Wang D, *et al.* A phase I safety and pharmacokinetic study of ABT-263 in combination with carboplatin/paclitaxel in the treatment of patients with solid tumors. *Invest New Drugs*, 2014, 32, p. 976-984.
- Voehringer DW, Meyn RE. Redox aspects of Bcl-2 function. *Antioxid Redox Signaling*, 2000, 2, p. 537–550.
- Vormittag L, Thurnher D, Geleff S, *et al.* Co-expression of Bmi-1 and podoplanin predicts overall survival in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck treated with radio(chemo)therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009, 73, p. 913-918.
- Vousden KH. Apoptosis. p53 and PUMA: a deadly duo. *Science*, 2005, 309, p. 1685-1686.
- Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8, p. 275-283.
- Walczak H, Bouchon A, Stahl H, *et al.* Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand retains its apoptosis-inducing capacity on Bcl-2- or Bcl-xL-overexpressing chemotherapy-resistant tumor cells. *Cancer Res*, 2000, 60, p. 3051-3057.
- Wang D, Song H, Evans JA, *et al.* Mutation and downregulation of the transforming growth factor beta type II receptor gene in primary squamous cell carcinomas of the head and neck. *Carcinogenesis*, 1997, 18, p. 2285-2290.
- Wang JL, Liu D, Zhang ZJ, *et al.* Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97, p. 7124-7129.
- Wang GQ, Gastman BR, Wieckowski E, *et al.* A role for mitochondrial Bak in apoptotic response to anticancer drugs. *J Biol Chem*, 2001, 276, p. 34307-34317.
- Wang SC, Nakajima Y, Yu YL, *et al.* Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. *Nat Cell Biol*, 2006, 8, p. 1359-1368.
- Wang P, Yu J, Zhang L. The nuclear function of p53 is required for PUMA-mediated apoptosis induced by DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007a, 104, p. 4054-4059.
- Wang Y, Nathans J. Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions. *Development*, 2007, 134, p. 647-658.
- Wang X, Wang J, Lin S, *et al.* Sp1 is involved in H₂O₂-induced PUMA gene expression and apoptosis in colorectal cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 2008a, 27, p. 44.
- Wang Z, Sun Y. Identification and characterization of two splicing variants of human Noxa. *Anticancer Res*, 2008b, 28, p. 1667-1674.
- Wang Y, Guan X, Fok KL, *et al.* A novel member of the Rhomboid family, RHBDD1, regulates BIK-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, 2008c, 65, p. 3822-3829.
- Wang J, Beauchemin M, Bertrand R. Phospho-Bcl-x(L)(Ser62) plays a key role at DNA damage-induced G(2) checkpoint. *Cell Cycle*, 2012a, 11, p. 2159-2169.
- Wang H, Yang YB, Shen HM, *et al.* ABT-737 induces Bim expression via JNK signaling pathway and its effect on the radiation sensitivity of HeLa cells. *PLoS One*, 2012b, 7, e52483.

- Wang YF, Chang CJ, Lin CP, *et al.* Expression of hedgehog signaling molecules as a prognostic indicator of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 2012c, 34, p. 1556-1561.
- Wang G, Liu L, Sharma S, *et al.* Bmi-1 confers adaptive radioresistance to KYSE-150R esophageal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012d, 425, 309-314.
- Wang J, Beauchemin M, Bertrand R. Phospho-Bcl-xL(Ser62) influences spindle assembly and chromosome segregation during mitosis. *Cell Cycle*, 2014, 13, p. 1313-1326.
- Wang WM, Zhao ZL, Ma SR, *et al.* Epidermal growth factor receptor inhibition reduces angiogenesis via hypoxia-inducible factor-1 α and Notch1 in head neck squamous cell carcinoma. *PLoS One*, 2015, 10, e0119723.
- Wanng M, Li X, Lu X, *et al.* Cancer stem cells promotes resistance of laryngeal squamous cancer to irradiation mediated by hypoxia. *Lin Chung Er Bi Yan HouTou Jing WaiKeZaZhi*, 2011, 25, p. 823-826.
- Ward IM, Minn K, van Deursen J *et al.* p53 Binding Protein 53BP1 Is Required for DNA Damage Responses and Tumor Suppression in Mice. *Mol Cell Biol*, 2003, 23, p. 2556-2563.
- Warner KA, Miyazawa M, Cordeiro MM, *et al.* Endothelial cells enhance tumor cell invasion through a crosstalk mediated by CXC chemokine signaling. *Neoplasia*, 2008, 10, p. 131-139.
- Warrier S, Bhuvanakshmi G, Arfuso F, *et al.* Cancer stem-like cells from head and neck cancers are chemosensitized by the Wnt antagonist, sFRP4, by inducing apoptosis, decreasing stemness, drug resistance and epithelial to mesenchymal transition. *Cancer Gene Ther*, 2014, 21, p. 381-388.
- Waterhouse NJ, Sedelies KA, Browne KA, *et al.* A central role for Bid in granzyme B-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 2005, 280, p. 4476-4482.
- Weber A, Paschen SA, Heger K, *et al.* BimS-induced apoptosis requires mitochondrial localization but not interaction with anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *J Cell Biol*, 2007, 177, p. 625-636.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, *et al.* Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, 2001, 292, p. 727-730.
- Wei Y, Pattingre S, Sinha S, *et al.* JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell*, 2008, 30, p. 678-688.
- Wei J, Stebbins JL, Kitada S, *et al.* BI-97C1, an optically pure Apogossypol derivative as pan-active inhibitor of antiapoptotic B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) family proteins. *J Med Chem*, 2010, 53, p. 4166-4176.
- Wei D, Zhang Q, Schreiber JS, *et al.* Targeting mcl-1 for radiosensitization of pancreatic cancers. *Transl Oncol*, 2015, 8, p. 47-54.
- Weissman I. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, 2000, 100, p. 157-168.
- Wertz IE, Kusam S, Lam C, *et al.* Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature*, 2011, 471, p. 110-114.

- Wiegmans AP, Alsop AE, Bots M, *et al.* Deciphering the molecular events necessary for synergistic tumor cell apoptosis mediated by the histone deacetylase inhibitor vorinostat and the BH3 mimetic ABT-737. *Cancer Res*, 2011, 71, p. 3603-3615.
- Wiesner DA, Kilkus JP, Gottschalk AR, *et al.* Anti-immunoglobulin-induced apoptosis in WEHI 231 cells involves the slow formation of ceramide from sphingomyelin and is blocked by bcl-xL. *J Biol Chem*, 1997, 272, p. 9868–9876.
- Wilkins HM, Marquardt K, Lash LH, *et al.* Bcl-2 is a novel interacting partner for the 2-oxoglutarate carrier and a key regulator of mitochondrial glutathione. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52, p. 410-419.
- Willis SN, Chen L, Dewson G, *et al.* Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev*, 2005, 19, p. 1294-1305.
- Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, *et al.* Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science*, 2007, 315, 856-859.
- Wilson A, Laurenti E, Oser G, *et al.* Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*, 2008, 135, p. 1118-1129.
- Wilson WH, O'Connor OA, Czuczman MS, *et al.* Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity. *Lancet Oncol*, 2010, 11, p. 1149–1159.
- Witham J, Valenti MR, De-Haven-Brandon AK, *et al.* The Bcl-2/Bcl-XL family inhibitor ABT-737 sensitizes ovarian cancer cells to carboplatin. *Clin Cancer Res*, 2007, 13, p. 7191-7198.
- Wolter KG, Wang SJ, Henson BS, *et al.* (-)-gossypol inhibits growth and promotes apoptosis of human head and neck squamous cell carcinoma in vivo. *Neoplasia*, 2006, 8, p. 163–172.
- Wu CP, Zhou L, Xie M, *et al.* Identification of cancer stem-like side population cells in purified primary cultured human laryngeal squamous cell carcinoma epithelia. *PLoS One*, 2013, 8, e65750.
- Wu H, Schiff DS, Lin Y, *et al.* Ionizing radiation sensitizes breast cancer cells to Bcl-2 inhibitor, ABT-737, through regulating Mcl-1. *Radiat Res*, 2014, 182, p. 618-625.
- Xia HF, Jin XH, Cao ZF, *et al.* MiR-98 is involved in rat embryo implantation by targeting Bcl-xl. *FEBS Lett*, 2014, 588, 574-583.
- Xiang Q, Tang H, Yu J, *et al.* MicroRNA-98 sensitizes cisplatin-resistant human lung adenocarcinoma cells by up-regulation of HMGA2. *Pharmazie*, 2013, 68, p. 274-281.
- Xiao K, Wang Y, Chang Z, *et al.* p32, a novel binding partner of Mcl-1, positively regulates mitochondrial Ca(2+) uptake and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 451, p. 322-328.
- Xin M, Deng M. Protein phosphatase 2A enhances the proapoptotic function of Bax through dephosphorylation. *J Biol Chem*, 2006, 281, p. 18859–18867.
- Xu J, Liao X, Lu N, *et al.* Chromatin-modifying drugs induce miRNA-153 expression to suppress Irs-2 in glioblastoma cell lines. *Int J Cancer*, 2011, 129, p. 2527-2531.
- Xu Y, Liao R, Li N, *et al.* Phosphorylation of Tip60 by p38 α regulates p53-mediated PUMA induction and apoptosis in response to DNA damage. *Oncotarget*, 2014a, 5, p. 12555-12572.

- Xu XH, Liu XY, Su J, *et al.* ShRNA targeting Bmi-1 sensitizes CD44⁺ nasopharyngeal cancer stem-like cells to radiotherapy. *Oncol Rep*, 2014b, 32, p. 764-770.
- Yajima T, Ochiai H, Uchiyama T, *et al.* Resistance to cytotoxic chemotherapy-induced apoptosis in side population cells of human oral squamous cell carcinoma cell line Ho-1-N-1. *Int J Oncol*, 2009, 35, p. 273-280.
- Yakovlev AG, Di Giovanni S, Wang G, *et al.* BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis. *J Biol Chem*, 2004, 279, p. 28367-28374.
- Yamaguchi H, Wang HG. Bcl-XL protects BimEL-induced Bax conformational change and cytochrome C release independent of interacting with Bax or BimEL. *J Biol Chem*, 2002, 277, p. 14604-14612.
- Yamaguchi R, Janssen E, Perkins G, *et al.* Efficient Elimination of Cancer Cells by Deoxyglucose-ABT-263/737 Combination Therapy. *PLoS One*, 2011, 6, e24102.
- Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol*, 1999, 19, p. 8469-8478.
- Yamano Y, Uzawa K, Saito K, *et al.* Identification of cisplatin-resistance related genes in head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 2010, 126, p. 437-449.
- Yang E, Zha J, Jockel J, *et al.* Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*, 1995, 80, p. 285-291.
- Yang F, Zeng Q, Yu G, *et al.* Wnt/beta-catenin signaling inhibits death receptor-mediated apoptosis and promotes invasive growth of HNSCC. *Cell Signal*, 2006, 18, p. 679-687.
- Yang S, Wang X, Contino G, *et al.* Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev*, 2011a, 25, p. 717-729.
- Yang JP, Liu Y, Zhong W, *et al.* Chemoresistance of CD133⁺ cancer stem cells in laryngeal carcinoma. *Chin Med J (Engl)*, 2011b, 124, p. 1055-1060.
- Yang X, Yin J, Yu J, *et al.* miRNA-195 sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to 5-FU by targeting BCL-w. *Oncol Rep*, 2012a, 27, p. 250-257.
- Yang X, Wang J, Zhou Y, *et al.* Hsp70 promotes chemoresistance by blocking Bax mitochondrial translocation in ovarian cancer cells. *Cancer Lett*, 2012b, 321, p. 137-143.
- Yang H, Diao LQ, Shi M, *et al.* Efficacy of intensity-modulated radiotherapy combined with chemotherapy or surgery in locally advanced squamous cell carcinoma of the head-and-neck. *Biologics*, 2013, 7, p. 223-229.
- Yazbeck VY, Li C, Grandis JR, *et al.* Single-agent obatoclax (GX15-070) potently induces apoptosis and pro-survival autophagy in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Oral Oncol*, 2014, 50, p. 120-127.
- Yee KS, Vousden KH. Contribution of membrane localization to the apoptotic activity of PUMA. *Apoptosis*, 2008, 13, p. 87-95.
- Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*, 1994, 369, p. 321-323.

- Yin H, Glass J. The phenotypic radiation resistance of CD44+/CD24(-or low) breast cancer cells is mediated through the enhanced activation of ATM signaling. *PLoS One*, 2011, 6, e24080.
- Yokogami K, Wakisaka S, Avruch J, Reeves SA. Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Curr Biol*, 2000, 10, p. 47-50.
- Yoon HS, Hong SH, Kang HJ, *et al.* Bfl-1 gene expression in breast cancer: its relationship with other prognostic factors. *J Korean Med Sci*, 2003, 18, p. 225-230.
- Yoshida A, Hsu LC, Davé V. Retinal oxidation activity and biological role of human cytosolic aldehyde dehydrogenase. *Enzyme*, 1992, 46, p. 239-244.
- You H, Pellegrini M, Tsuchihara K, *et al.* FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. *J Exp Med*, 2006, 203, p. 1657-1663.
- Yu CL, Meyer DJ, Campbell GS, *et al.* Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science*, 1995, 269, p. 81-83.
- Yu J, Wang Z, Kinzler KW, *et al.* PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100, p. 1931-1936.
- Yu J, Zhang L. PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene*, 2008, 27, p. 71-83.
- Yuan S, Akey CW. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure*, 2013, 21, p. 501-515.
- Zall H, Weber A, Besch R, *et al.* Chemotherapeutic drugs sensitize human renal cell carcinoma cells to ABT-737 by a mechanism involving the Noxa-dependent inactivation of Mcl-1 or A1. *Mol Cancer*, 2010, 9, p. 164.
- Zeuner A, Francescangeli F, Contavalli P, *et al.* Elimination of quiescent/slow-proliferating cancer stem cells by Bcl-XL inhibition in non-small cell lung cancer. *Cell Death Differ*, 2014, 21, p. 1877-1888.
- Zha H, Aimé-Sempé C, Sato T, *et al.* Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J Biol Chem*, 1996, 271, p. 7440-7444.
- Zhang M, Liu H, Guo R, *et al.* Molecular mechanism of gossypol-induced cell growth inhibition and cell death of HT-29 human colon carcinoma cells. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66, p. 93-103.
- Zhang C, Zhang J, Zhang A, *et al.* PUMA is a novel target of miR-221/222 in human epithelial cancers. *Int J Oncol*, 2010, 37, p. 1621-1626.
- Zhang C, Cai TY, Zhu H, *et al.* Synergistic antitumor activity of gemcitabine and ABT-737 in vitro and in vivo through disrupting the interaction of USP9X and Mcl-1. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10, p. 1264-1275.
- Zhang T, Saghatelian A. Emerging roles of lipids in BCL-2 family-regulated apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1831 p. 1542-1554.
- Zhang H, Jia R, Wang C, *et al.* Piceatannol promotes apoptosis via up-regulation of microRNA-129 expression in colorectal cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014a, 452, p. 775-781.

Zhang F, Li Y, Wu H, *et al.* MiR- 192 confers cisplatin resistance by targeting Bim in lung cancer. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2014b, 17, p. 384-390.

Zhong Z, Wen Z, Darnell JE Jr. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*, 1994, 264, p. 95-98.

Zhu X, Zhou X, Lewis MT, *et al.* Cancer stem cell, niche and EGFR decide tumor development and treatment response: A bio-computational simulation study. *J Theor Biol*, 2011, 269, p. 138-149.

Zinkel SS, Hurov KE, Ong C, *et al.* A role for proapoptotic BID in the DNAdamage response. *Cell*, 2005, 122, p. 579-591.

Zinn RL, Gardner EE, Dobromilskaya I, *et al.* Combination treatment with ABT-737 and chloroquine in preclinical models of small cell lung cancer. *Mol Cancer*, 2013, 12, p. 16.

Zong WX, Edelstein LC, Chen C, *et al.* The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev*, 1999, 13, p. 382-387.

Zhong Q, Gao W, Du F, *et al.* Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell*, 2005, 121, p. 1085–1095.

Zhou L, Wei X, Cheng L, *et al.* CD133, one of the markers of cancer stem cells in Hep-2 cell line. *Laryngoscope*, 2007, 117, 455-460.

Zhu H, Zhang L, Dong F, *et al.* Bik/NBK accumulation correlates with apoptosis-induction by bortezomib (PS-341, Velcade) and other proteasome inhibitors. *Oncogene*, 2005, 24, p. 4993-4999.

Zimmermann AK, Loucks FA, Schroeder EK, *et al.* Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: a molecular basis for Bcl-2 antioxidant function at mitochondria. *J Biol Chem*, 2007, 282, p. 29296-29304.

Zong WX, Li C, Hatzuvassiliou G, *et al.* Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol*, 2003, 162, p. 59–69.

Annexes

Communications orales et affichées

Communications orales

Marion Gilormini, Céline Malésys, Claire Rodriguez-Lafrasse, Dominique Ardail. Un inhibiteur de Bcl-2 augmente la réponse à la radiothérapie des carcinomes des voies aérodigestives supérieures en diminuant le taux de glutathion intra-mitochondrial. 18^{ème} journée scientifique de l'Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences et Santé, le 03 Octobre 2013 à Villeurbanne.

Marion Gilormini, Céline Malésys, Claire Rodriguez-Lafrasse, Dominique Ardail. Un inhibiteur de Bcl-2, l'ABT-737, augmente la réponse à l'irradiation des carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures en ciblant le glutathion intra-mitochondrial. 11^{ème} Colloque International de Radiobiologie Fondamentale et Appliquée (CIRFA) du 06 au 10 Octobre 2013 à Montpellier.

Communications affichées

Marion Gilormini, Claire Rodriguez-Lafrasse, Dominique Ardail. Validation d'une stratégie chimio-radiothérapeutique ciblant la mitochondrie pour le traitement des cancers des voies aéro-digestives supérieures. 8^{ème} Journées Scientifiques du Cancéropole Lyon Auvergne Rhône-Alpes (CLARA) le 21 et 22 Mars 2013 à Lyon.

Marion Gilormini, Céline Malésys, Claire Rodriguez-Lafrasse, Dominique Ardail. The Bcl-2 inhibitor, ABT-737, enhances the response of radiations in head and neck squamous cell carcinoma by depleting intra-mitochondrial glutathione. 40th European Radiation Research (ERR2013) du 01 au 05 Septembre 2013 à Dublin (Irlande).

Publications

Gilormini *et al.*, JoVE, in press.

TITLE:

Isolation and characterization of a head and neck squamous cell carcinomas subpopulation having stem cell characteristics

AUTHORS:

Gilormini, Marion ; Wozny, Anne-Sophie ; Battiston-Montagne, Priscillia ; Ardail, Dominique ; Alphonse, Gersende ; Rodriguez-Lafrasse, Claire.

KEYWORDS:

Head and neck squamous cell carcinoma, cancer stem cells, fluorescent activated cell sorting, aldehyde dehydrogenase, CD44, cell line

SHORT ABSTRACT:

Understanding the role of cancer stem-like cells in tumor recurrence and resistance to therapies has become a topic of great interest in the last decade. This article describes the isolation and characterization of the sub-population of cancer stem-like cells from head and neck squamous carcinoma cell lines (HNSCC).

LONG ABSTRACT:

Despite advances in the understanding of head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) progression, the five-year survival rate remains low due to local recurrence and distant metastasis. One hypothesis to explain this recurrence is the presence of cancer stem-like cells (CSCs) that present inherent chemo- and radio-resistance. In order to develop new therapeutic strategies, it is necessary to have experimental models that validate the effectiveness of targeted treatments and therefore to have reliable methods for the identification and isolation of CSCs. To this end, we present a protocol for the isolation of CSCs from human HNSCC cell lines that relies on the combination of two successive cell sortings performed by fluorescence activated cell sorting (FACS). The first one is based on the property of CSCs to overexpress ATP-Binding Cassette (ABC) transporter proteins and thus exclude, among others, vital DNA dyes such as Hoechst 33342. The cells sorted with this method are identified as a “side population” (SP). As the SP cells represent a low percentage (<5 %) of parental cells, a growing phase is necessary in order to increase their number before the second cell sorting. The next step allows for the selection of cells that possess two other HNSCC stem cell characteristics i.e. high expression level of the cell surface marker CD44 (CD44^{high}) and the over-expression of aldehyde dehydrogenase

(ALDH^{high}). Since the use of a single marker has numerous limitations and pitfalls for the isolation of CSCs, the combination of SP, CD44 and ALDH markers will provide a useful tool to isolate CSCs for further analytical and functional assays requiring viable cells. The stem-like characteristics of CSCs was finally validated in vitro by the formation of tumorspheres and the expression of β -catenin.

INTRODUCTION:

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is a common malignancy worldwide and despite progress in current treatments, patients with advanced disease have a poor prognosis. The overall 5-year survival rate of the patient is around 30% despite the combination of therapeutic approaches including surgery, chemo-radiotherapy and targeted-therapies. Recent studies attribute local recurrence and distant metastasis to the survival of cancer stem-like cells (CSCs) following anticancer therapies¹. There is accumulating evidence supporting the existence of cells presenting stem cells properties (undifferentiated status, self-renewal and differentiation capacities, and telomerase activity) in various solid tumors including breast, brain, prostate, lung, colon, pancreas, liver and skin²⁻¹⁰. However, the origin of CSCs remains unclear^{11, 12}. They may result from the malignant transformation of normal stem cells^{3,13} or dedifferentiation of tumor cells that acquire CSCs-like features^{14,15}. Therefore, understanding distinctive pathways relating to CSCs will provide insight into early diagnosis and treatment of resistant HNSCC.

It has been proposed that CSCs also possess resistant phenotypes that evade standard chemotherapy and radiotherapy, resulting in tumor relapse compared to the bulk of tumor cells¹⁶⁻¹⁹ and are localized into hypoxic niches.²⁰ Numerous factors have been proposed to explain these resistances of CSCs, such as propensity to quiescence, enhanced DNA repair, up-regulated cell cycle control mechanisms, and free-radical scavenging²¹. Moreover, several oncogenic molecular pathways may be specifically activated in CSCs¹⁷. In order to improve knowledge of CSCs for further targeted-therapies, we need reliable methods for the identification and isolation of CSCs, owing to the heterogeneity of stem cell-related markers in various types of cancers²².

In HNSCC, stem-like tumor-initiating cells have been isolated from primary patient tumors by sorting cells expressing different CSC biomarkers (such as drug efflux transporters expression²³, CD44^{high}, CD24^{low} CD133^{high}, c-Met⁺ phenotype^{10, 24, 25}, or ALDH^{high} activity²⁶) or cultivating primary patient tumor to form squamospheres that have CSC properties. Nevertheless, the number of squamospheres decreases dramatically after two passages, thus giving a small sample size for further characterization studies²⁷. Therefore, in vitro assays starting from well-established cell lines is an easier solution to design experiments in order to improve knowledge of CSCs.

The aim of this article is to propose a method to isolate CSCs from HNSCC cell lines using multiparametric flow cytometric analysis and cell sorting. The expression of CD44 in correlation with several CSCs properties including ALDH activity, Side Population (SP) phenotype, spheroid formation ability and tumorigenicity are used to isolate and characterize this sub-population of CSCs. CD44, a cell-surface glycoprotein, is involved in cell adhesion and migration. CD44 is highly expressed in many solid tumors CSCs²⁸, including in head and neck cancer models²⁹⁻³¹. Moreover, CD44^{high} cells can generate *in vivo* a heterogeneous tumor whereas CD44^{low} cells cannot¹⁰. The SP assay is based on the differential potential of cells to efflux the Hoechst dye²² via the ATP-binding cassette (ABC) family of transporter proteins overexpressed within the CSC membrane. This assay includes the use of ABC transporter inhibitors such as verapamil in control samples. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) is an intracellular enzyme that is involved in converting retinol to retinoic acid during early stem cell differentiation²⁵. Cells having a high ALDH activity show a stem-like cell behavior in HNSCC²⁶ and a very few number of ALDH^{high} cells are able to generate tumors *in vivo*^{26, 32}.

The combination of these markers and properties was successfully used by Bertrand et al. to study the resistance *in vitro* and *in vivo* of these CSCs to photon and carbon ion radiation¹⁹. Their results clearly showed that the combination of various cell markers and properties are more selective for useful studies on HNSCC CSCs populations than single-marker approaches.

PROTOCOL:

All animal procedures were performed according to local guidelines on animal care. All the details of this study were approved by the CECCAPP, a French ethics committee.

1. Selection of a side population (SP) by the Hoechst dye efflux assay

1.1) Staining of cells with Hoechst 33342 dye starting with 50 million of cells.

1.1.1) Prepare two 15 mL sterile tubes with a conical bottom: one tube labeled “Hoechst” and one labeled “Hoechst and Verapamil”. Prepare 10 mL of 5 mM Verapamil hydrochloride solution in sterile water. Prepare the culture medium (CM) for stem cells.

1.1.1.1) To prepare CM for CSC (CM-CSC), combine the following: Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM):F12 (1:3, v:v), 5 % of fetal calf serum (FCS), 0.04 mg/L of hydrocortisone, 100 U/mL of penicillin, 0.1 g/L of streptomycin, and 20 µg/L of EGF (Epidermal Growth Factor).

1.1.2) Under a laminar flow hood, trypsinize cells. Remove media, wash with sterile phosphate buffered saline (PBS) and add 1 mL of trypsin-EDTA (0.5 g/L) for a 75 cm² flask. Incubate 3 min at 37°C. Stop

the reaction by adding culture medium used for the parental cell line. Count the number of cells using a cell counter.

1.1.2.1) To prepare CM for parental cell line (CM-P), supplement DMEM with 10 % FCS, 0.4 mg/L of hydrocortisone, 100 U/mL of penicillin and 0.1 g/L of streptomycin).

1.1.3) Dilute the cell suspension obtained in the step 1.1.2) to obtain 107 cells/mL in CM-P. Split the cell suspension in the 2 tubes prepared: put 100 μ L (106 cells) in the tube “Hoechst and Verapamil” and 4 mL (4x107 cells) in the tube “Hoechst”.

1.1.4) In the sample “Hoechst and Verapamil”, add 10 μ L of 5 mM Verapamil hydrochloride solution (final concentration: 0.5 mM) and mix gently. Add 5 μ L of 1 g/L Hoechst solution (final concentration: 0.1 g/L). In the sample “Hoechst”, add 5 μ L of 1 g/L Hoechst solution per 106 cells (200 μ L total). Henceforth, keep samples protected from direct light exposure using aluminum foil.

1.1.5) Incubate all tubes in a water bath at 37 °C for 1 h 30 min. Mix gently every 15 min to prevent cells from settling down.

1.1.6) Centrifuge tubes at 250 x g for 5 min at 4 °C. Remove supernatant and resuspend each pellet with 2 mL of 1X PBS.

1.1.7) Centrifuge tubes at 250 x g for 5 min at 4 °C. Remove supernatant. Resuspend “Hoechst and Verapamil” pellet in 500 μ L of 5 mg/L propidium iodide (PI) diluted in PBS buffer and “Hoechst” pellet in 4 mL of 5 mg/L PI diluted in PBS buffer.

1.1.8) Transfer sample solutions through a 70 μ m cell strainer to remove aggregates and collect single cells in tubes for sample uptake on the flow cytometer. Keep samples on ice and protect from direct light exposure using aluminum foil.

1.2) Isolation of the side population excluding Hoechst dye by cell sorting

1.2.1) Perform Hoechst negative cell separation on a flow cytometry sorter with the following parameters: UV laser (355 nm), 2 detectors on the UV laser path with blue Hoechst (450/50 BP) and red Hoechst (610/20 BP) filters, and 2 collectors.

1.2.1.1) First, analyze sample “Hoechst” that serves as a positive control for staining and flow cytometer set-up.

1.2.1.2) Using the cytometer software, on the “Global Worksheet” window, click on the fifth top right picture named “Dot Plot” and create a chart on the global worksheet. On ordinate, select FSC-A (forward scatter) with a right click and on abscissa SSC (side scatter) (Figure 1A). In the same way, create a SSC-

W versus SCC-H dot plot. On this second dot plot, to create a P1 region, click on the fourteenth top right picture named “Polygon gate” and select single cells and discriminate doublets (Figure 1B)33.

1.2.1.3) Optional: Exclude PI positive cells by creating a FSC versus PI gated on P1. On this dot plot, select the PI negative population (P2) to exclude died PI positive cells.

1.2.1.4) Using the cytometer software, on the “Global Worksheet” window, click on the fifth top right picture named “Dot Plot” and create a chart on the global worksheet. On ordinate, with a right click, select blue Hoechst-A and on abscissa, red Hoechst-A. With a right click on the population, select “Show population” and P1. On this dot plot, create a region (P2) to select the negative Hoechst dye side population (SP) cells that appears as a side arm on the left of the main population of cells (Figure 1C).

1.2.2) Analyze the sample “Hoechst” and collect 10000 events. To ensure that the gate P2, which represents the SP population, is well positioned, analyze the sample “Hoechst and Verapamil” (10000 events) to observe the disappearance of SP population (Figure 1D).

1.2.3) Collect the SP Hoechst dye negative cells in a 15 mL tube containing 1 mL of CM-CSC prepared in 1.1.1.1.

1.2.4) At the end of the cell sorting, centrifuge the cell suspension at 250 x g for 5 min, remove the supernatant and resuspend the pellet with 1 mL of CM-CSC. Count the number of sorted cells using a cell counter. Transfer cells to appropriate culture flask (see Table 1). Add CM-CSC and incubate at 37 °C and 5 % CO₂ atmosphere.

1.2.5) Maintain cells in culture under the same conditions for a maximum of 2 passages until there is a minimum of 4 x 10⁷ cells (see step 3. “Cell culture method”).

2. Selection of the CD44^{high}/ALDH^{high} sub-population in the side population sorted

2.1) Staining 50 million of SP cells with the ALDH detection kit and CD44 antibody.

2.1.1) Prepare seven 15 mL sterile tubes labeled as follows: “Unstained” (Tube a), “CD44-APC” (Tube b), “IgG1-APC” (Tube c), “ALDH” (Tube d), “ALDH and DEAB” (Tube e), “ALDH and CD44-APC” (Tube f), “ALDH, DEAB and CD44-APC” (Tube g). Keep all tubes and reagents at 4°C during the staining.

2.1.2) Prepare buffer A with 4.5 mL of the buffer 1 (contained in the kit) and 45 µL of CD44-APC (Allophycocyanin) antibody (dilution 1:100). Prepare buffer B with 100 µL of buffer 1 and 1 µL of IgG1-APC antibody (dilution 1:100). Prepare buffer C with 4 mL of buffer 1 and 20 µL of the reagent of the kit.

2.1.3) Prepare a cell suspension of the previously sorted cells (step 1.2.5) at 107 cells /mL. Add 100 μ L (106 cells) of the cell suspension to tubes a, b and c, and 4 mL (4x107 cells) to tube f. For the moment do not put cells in tubes d, e and g.

2.1.4) Centrifuge the tubes containing the cells at 250 x g for 5 min. Remove the supernatant and resuspend the pellets in tubes a, b and c in 100 μ L of buffer 1. Add 5 μ L of diethylaminobenzaldehyde (DEAB), an ALDH inhibitor to tubes e and g.

2.1.4.1) Resuspend cells in tube f with 4 mL reagent C and immediately transfer 100 μ L into tubes d, e and g. Incubate all tubes in a water bath at 37 °C for 30 min and protect from direct light exposure using aluminum foil. Mix the cell suspension gently by vortexing after 15 min to prevent cells from settling.

2.1.5) From this moment, keep the tubes on ice and protected from direct light exposure using aluminum foil. Centrifuge all tubes at 250 x g for 5 min at 4 °C and remove the supernatant.

2.1.6) Resuspend tube f in 4 mL and tubes b and g with 100 μ L of buffer A. Resuspend tube c with 100 μ L of buffer B. To the other tubes, add 100 μ L of buffer 1. Incubate 10 min at 4 °C.

2.1.7) Centrifuge all tubes at 250 x g for 5 min at 4 °C and remove the supernatant. Rinse once with 1 mL of buffer 1 (4 mL for tube f) and centrifuge again at 250 x g for 5 min at 4 °C. Remove the supernatant. Re-suspend tube f pellet in 4 mL and all other tubes in 1 mL of buffer 1.

2.1.8) Transfer the sample solutions through 70 μ m cell strainers to remove aggregates and collect single cells in appropriate tubes for sample uptake on flow cytometer.

2.2) Isolation of the CD44^{high}/ALDH high cell population by fluorescence activated cell sorting

2.2.1) Perform CD44^{high}/ALDH high cell sorting on a flow cytometry sorter with the following parameters: Blue laser (488 nm) and red laser (633 nm), 1 detector on the blue laser path with a FITC filter (530/30), 1 detector on the red laser path with an APC filter (660/20) and 2 collectors.

2.2.2) Using the cytometer software, click on the fifth top right picture to create a FSC-A versus SSC-A dot plot as described in section 1.2.1.2, to check cell morphology and select a population composed of single cells with a SSC-W versus SSC-H dot plot.

2.2.3) Using the cytometer software, on the “Global Worksheet” window, click on the fifth top right picture named “Dot Plot” and create a chart on the global worksheet. On ordinate, select APC-A with a right click and on abscissa FITC-A in order to select the double stained population. Create a gate using tubes d and e to select ALDH^{high} cells (Figure 2A). Note: Positive cells disappear in tube e treated with DEAB (Figure 2B).

2.2.3.1) On the same chart, create a second gate using tubes b and c in order to select CD44^{high} cells (Figure 2C and 2D). Positive cells disappear in the tube containing IgG1-APC. Analyze tubes f and g and create a third gate that includes CD44^{high}/ALDH^{high} cells (Figure 2E and 2F).

Note: If positive cells are present in the tube containing IgG1-APC, the interaction between cells and the APC-stained antibody is not specific.

2.2.4) Collect CD44^{high}/ALDH^{high} cells into a 15 mL tube containing 1 mL of CM-CSC. Collect also CD44^{low}/ALDH^{low} into a 15 mL tube containing 1 mL of CM19. Note: Prepare CM-CSC as described in step 1.1.1.1.

2.2.5) Centrifuge the cell suspension at 250 x g for 5 min, remove the supernatant and resuspend the pellet with 1 mL of CM-CSC. Count the number of sorted cells.

3. Cell culture method

3.1) After the double-sorting of the cells as described above, plate the sorted cells into an appropriate culture flask (Table 1) with CM-CSC at 37 °C with 5 % CO₂. After 18-24h, check if the cells have adhered and change the culture medium. Change the culture medium every 3 days until the expanding colonies are greater than 50% confluent.

3.2) Use the appropriate volume of trypsin 0.5 g/L – EDTA (Table 1) to trypsinize cells from the culture flask. Incubate cells 3 to 5 min at 37°C. Add the appropriate volume of CM-CSC (Table 1) to stop the action of trypsin.

3.3) Count the number of cells obtained and plate 4x10⁵ cells in a 175 cm² culture flask with CM-CSC. Incubate at 37 °C and 5 % CO₂. At this concentration, cells with a doubling time of 24 hours will be 70% confluent in 7 days.

3.4) Use CSCs for in vitro or in vivo experiments before they have undergone 3 passages.

4. Confirmation of tumor potential and CSC characteristics

4.1) Tumor sphere formation to confirm the tumor potential of the CD44^{high}/ALDH^{high} cells.

4.1.1) Trypsinize cells as described in 3.2. Add 1x10⁶ cells to a 15 mL tube and centrifuge at 250 x g for 5 min. Remove the supernatant and re-suspend the pellet in a serum-low DMEM:F12 (3:1) medium FCS free, 20 ng/mL of rhEGF, 4 mg/L of heparin and 1X B27. Incubate cells in a 6 well low anchorage plates culture flask at 37 °C and 5 % CO₂.

Note : Use DMEM:F12 (3:1) medium containing 5 % of FCS, 20 ng/mL of rhEGF, 4 mg/L of heparin and 1X B27 if cell do not grow without FCS

4.1.2) Observe the tumor sphere formation with an optical microscope from 4 to 10 days after seeding (Figure 3A). Tumor sphere diameter should be more than 35 μ m. Note: CD44^{high}/ALDH^{high} cells will show a faster and more enhanced tumor sphere formation in terms of number and size compared to CD44^{low}/ALDH^{low}.

4.2) Evaluation of in vivo tumorigenicity after subcutaneous injection of CD44^{high}/ALDH^{high} cells in NOD-SCID mice.

4.2.1) After sorting, re-suspend cells in PBS at three different concentrations (10⁴ cells/mL, 10⁵ cells/mL, and 10⁶ cells/mL). Inject subcutaneously 100 μ L of 10⁴ cells/mL (10³ cells) in the right flank region of 6 mice. Do the same for 10⁵ cells/mL (10⁴ cells), and 10⁶ cells/mL (10⁵ cells). Note: Lower dilution than 10³ cells can be tested.

4.2.2) Inject the same concentration of CD44^{low}/ALDH^{low} cells in the left flank region. Monitor injected mice for up to 10 weeks to see tumor progression¹⁹.

REPRESENTATIVE RESULTS:

The isolation of CSCs from HNSCC cell lines required two successive sorting because of the very low percentage of CSCs in the parental cell line. The first sorting was based on the ability of CSCs to exclude the Hoechst dye due to drug efflux transporters. This resulted in acquisition of 1 - 5 % of the total cell population sorted (Figure 1). During the Hoechst dye negative cell sorting, check the size and granulation of sorted cells by looking at the FSC-A versus SSC-A dot plot (Figure 1A). Then, discriminate doublets and cells fragments by using the SSC-W versus SSC-H dot plot and selecting the population P1 (Figure 1B). On this P1 population, create a Hoechst Red-A versus Hoechst Blue-A dot plot. With the tube labeled “Hoechst”, the SP appears as a side arm on the left from the main cells population (Figure 1C). This population must disappear when they are treated with Verapamil (Figure 1D), an inhibitor of ABC transporters. The PI staining allows the exclusion of PI-positive dead cells because this population is under-scale on the Hoechst Red-A scale (Figure 1C and 1D, blue ellipses).

The second cell sorting was based on the high expression of the CD44 receptor and high ALDH enzyme activity which allowed the acquisition of 0.5-2% from the SP cells previously sorted (Figure 2). Before the sorting, various controls were used. The first ones are the “ALDH” and the “ALDH + DEAB” tubes needed in order to place the first gate on FITC^{high} cells (Figures 2A and 2B): ALDH^{high} cells were gated on the FITC-A versus APC-A dot plot using the “ALDH” tube (Figure 2A). The good position of the gate was checked using the “ALDH + DEAB” tube: as DEAB inhibits ALDH, positive cells must disappear from the gate (Figure 2B). If they don't, change the reaction conditions (by increasing the

amount of DEAB for example). The second control is the “CD44-APC” and the “IgG1-APC” tubes which allowed to position the second gate on APC^{high} cells (Figures 2C and 2D) using the cells stained with the CD44-APC antibody (Figure 2C). This population must disappear with the control tube which contained IgG1-APC cells (Figure 2D). If it does not, the bond with the antibody is not specific and BSA 0.5% should be added into buffer 1 from the ALDH detection kit during the antibody reaction. Finally, the third control concerns the “ALDH and CD44-APC” tube and “ALDH, DEAB and CD44-APC” tubes (Figures 2E, 2F, 2G and 2H). The double staining ALDH/CD44 tube is used to position the last gate on the double positive cells (Figure 2E) and the same tube treated with DEAB is a control to verify that ALDH^{high} cells disappear (Figure 2F).

This protocol is used to sort CSCs from the SQ20B and the FaDu cell lines. When the sorting is done for the first time on a new cell line, in order to ensure that sorted cells have stem-like cells properties, it is necessary to confirm their tumor potential. One of stem like cells properties is their ability to form tumorspheres in vitro in a FSC free medium. Under this condition, only cancer stem-like cells can survive and proliferate (Figure 3A). Moreover, qPCR experiments show a high expression of β -catenin in CD44^{high}/ALDH^{high} cells as a stem-like characteristic (Figure 3B), as well as Bmi-1 and Notch19. Finally, CD44^{high}/ALDH^{high} cells are also able to form tumors when injected in a lowest quantity than with CD44^{low}/ALDH^{low} cells¹⁹.

FIGURE LEGENDS:

Figure 1: Isolation of a side population excluding the Hoechst dye. (A) FSC-A versus SSC-A dot plot. (B) SSC-W versus SSC-H dot plot. (C, D) Hoechst Red-A versus Hoechst Blue-A dot plot using the “Hoechst” tube (C) or with the “Hoechst and Verapamil” tube (D).

Figure 2: Sorting of CD44^{high}/ALDH^{high} cells from Hoechst dye negative cells. FITC-A versus APC-A dot plot using the “ALDH” tube (A), the “ALDH + DEAB” tube (B), the “CD44-APC” tube (C), the “IgG1-APC” tube (D), the “ALDH and CD44-APC” tube (E and G) or the “ALDH, DEAB and CD44-APC” tube (F and H). Figures A, B, C, D, E and F concern the SQ20B cell line, although figures G and H concern the FaDu cell line. Green points indicate CD44^{low}/ALDH^{low} cells (Q3); dark blue points show CD44^{low}/ALDH^{high} cells (Q1); purple points show CD44^{high}/ALDH^{low} cells (Q4); light blue points show CD44^{high}/ALDH^{high} cells (Q2).

Figure 3: Confirmation of tumor potential of CD44^{high}/ALDH^{high} cells. Sorted CD44^{high}/ALDH^{high} cells were able to form tumorspheres in vitro (A) in a poor-FCS media. Scale bar, 25 μ m. Furthermore, CD44^{high}/ALDH^{high} overexpress β -catenin, a marker of tumorigenicity (B). This quantification has been performed by qPCR and error bars represent SD.

Table 1: Culture flask type to use according to the number of cells sorted. Details of the culture flask size for approximate number of cells sorted are given. The volume of trypsin and volume of medium required for the culture flask type are also provided.

DISCUSSION:

This protocol describes a reliable method for the successful isolation of CSCs from a specific cell line that is applicable to other HNSCC cell lines. Isolated head and neck CSCs are then suitable for further molecular characterization in vitro and functional validation by transplantation in immunodeficient mice¹⁹. However, some modifications can be tested depending on the side population or the CD44^{high}/ALDH^{high} percentages present in the parental cell line. For example, if the percentage of cells in the side population is too low in a particular cell line, the CD44^{high}/ALDH^{high} sorting can be performed directly. In some cases, the markers used in this study may be replaced by other more appropriate to the cell line studied such as CD133^{high} 34 or CD10^{high} 35.

This protocol is based on two cell sortings since a 3 colors sort with SP + CD44 + ALDH is not possible with the cell lines tested. Firstly, there is too few CD44⁺/ALDH⁺ cells in the parental cell lines tested (there is less than 5% of SP into the parental cell line, and less than 10% of CD44⁺/ALDH⁺ cells in the SP, so that SP/CD44⁺/ALDH⁺ represent less than 0.5% of the parental cell line), that's why a first SP sorting is necessary, in order to enrich the population in CD44⁺ and/or ALDH⁺ cells. Secondly, to sort 1% of the parental cell line, it takes 5 hours to obtain approximately 300 000 cells. If a 3 colors cell sorting is done, a very few quantity of cells will be collected, and a longer sorting is not recommended to maintain cells viability.

Owing to the selectivity of this isolation protocol, its main limitation is the small number of CSCs obtained. This could be problematic to perform further experiments, since it is not recommended to use them after 3 passages because of the rapid loss of CD44 and ALDH markers. Furthermore, before each new experiment, the percentage of CD44^{high}/ALDH^{high} cells still present in the cell suspension should be tested in order to check the number of CSCs that has differentiated.

It is imperative to prepare Verapamil hydrochloride solution and culture medium containing EGF just before use as these molecules are very unstable. A stock solution of EGF at 20 mg/L is stable for three months at -20 °C. Variations of the Hoechst protocol exist, but the final dye concentration commonly used is 5 µg/mL. Moreover, during the first sorting, different culture media compositions should be tested according to the cell line used. Once the sorting conditions are validated, it is necessary to check the properties of the sorted cell population using the different methods (section 4).

Cell surface markers, ALDH activity and ability to efflux vital dyes have been already used individually in the literature to isolate CSCs from HNSCC. However, the protocol described here has the unique advantage of using combinations of various markers in order to achieve high specificity in CSCs isolation from HNSCC cell lines. Moreover, the CD44 sorting could be realized with an antibody anti-

CD44 conjugated with magnetic micro-beads and sorted with a magnetic column³⁶, but this method is only applicable to cell surface markers and cannot be used for an ALDH sorting, preventing the double sorting to be performed. Another method used to obtain CSCs is the tumorsphere culture from primary tumors³⁷ or xenografts³⁸. However, the acquisition of these primary tumors or xenografts are associated with ethical constraints.

Since this method isolates viable HNSCC CSCs, they can be used, after checking their tumorigenicity, in a number of experiments that measure the physiological function of these cells. It therefore allows to assess the behavior of CSCs following different therapeutic approaches (radiotherapy, chemotherapy) and to study various biological parameters such as migration/ invasion, DNA repair, cell signaling, etc. Hence, obtaining CSCs from different cell lines is an attractive choice to investigate CSCs properties.

ACKNOWLEDGMENTS:

We thank Thibault Andrieu and Sebastien Dussurgey from the Flow Cytometry Platform of UFR BioSciences Gerland-Lyon-Sud (UMS3444/US8) for their advice and help during our sorting. This work was achieved within the scientific framework of ETOILE and Labex-PRIMES (ANR-11LABX-0063).

DISCLOSURES:

The authors have nothing to disclose.

REFERENCES:

1. Baumann, M., Krause, M., Hill, R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nat Rev Cancer*. 8 (7), 545–554, doi: 10.1038/nrc2419 (2008).
2. Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., Clarke, M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100 (7), 3983–3988, doi: 10.1073/pnas.0530291100 (2003).
3. Singh, S.K., et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 432 (7015), 396–401, doi: 10.1038/nature03128 (2004).
4. Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., Maitland, N.J. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*. 65 (23), 10946–10951, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2018 (2005).
5. Eramo, A., et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*. 15 (3), 504–514, doi:10.1038/sj.cdd.4402283 (2008).
6. Dalerba, P., et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104 (24), 10158–10163, doi: 10.1073/pnas.0703478104 (2007).
7. Hermann, P.C., et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*. 1 (3), 313–323, doi: 10.1016/j.stem.2007.06.002 (2007).

8. Yang, Z.F., et al. Significance of CD90 cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell*. 13 (2), 153–166, doi: 10.1016/j.ccr.2008.01.013 (2008).
9. Fang, D., et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res*. 65 (20), 9328–9337, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1343 (2005).
10. Prince, M.E., et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104 (3), 973–978, doi: 10.1073/pnas.0610117104 (2007).
11. Clarke, M.F., et al. Cancer stem cells -- Perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*. 66 (19), 9339–9344, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3126 (2006).
12. Soltanian, S., Matin, M.M. Cancer stem cells and cancer therapy. *Tumor Biol*. 32 (3), 425–440, doi: 10.1007/s13277-011-0155-8 (2011).
13. Molyneux, G., et al. BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell Stem Cell*. 7 (3), 403–417, doi: 10.1016/j.stem.2010.07.010 (2010).
14. Vermeulen, L., et al. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105 (36), 13427–13432, doi: 10.1073/pnas.0805706105 (2008).
15. Ratajczak, M.Z. Cancer stem cells -- Normal stem cells "Jedi" that went over to the "dark side." *Folia Histochem Cytobiol*. 43 (4), 175–181 (2005).
16. Bao, S., et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 444 (7120), 756–760, doi:10.1038/nature05236 (2006).
17. Liu, G., et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer*. 5, 67, doi: 10.1186/1476-4598-5-67 (2006).
18. Moncharmont, C., et al. Targeting a cornerstone of radiation resistance: Cancer stem cell. *Cancer Lett*. 322 (2), 139–147, doi: 10.1016/j.canlet.2012.03.024. (2012).
19. Bertrand, G., et al. Targeting Head and Neck Cancer Stem Cells to Overcome Resistance to Photon and Carbon Ion Radiation. *Stem Cell Rev*. 10(1):114-126, doi: 10.1007/s12015-013-9467-y. (2013).
20. Das, B., Tsuchida, R., Malkin, D., Koren, G., Baruchel, S., Yeger, H. Hypoxia enhances tumor stemness by increasing the invasive and tumorigenic side population fraction. *Stem Cells*. 26 (7), 1818–1830, doi: 10.1634/stemcells.2007-0724 (2008).
21. Diehn, M., et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*. 458 (7239), 780–783, doi: 10.1038/nature07733 (2009).
22. Chen, Z.G. The cancer stem cell concept in progression of head and neck cancer. *J Oncol*. 2009, 894064, doi: 10.1155/2009/894064 (2009).

23. Zhang, P., Zhang, Y., Mao, L., Zhang, Z., Chen, W. Side population in oral squamous cell carcinoma possesses tumor stem cell phenotypes. *Cancer Lett.* 277 (2), 227–234, doi: 10.1016/j.canlet.2008.12.015 (2009).
24. Zhang, Q., et al. A subpopulation of CD133(+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. *Cancer Lett.* 289 (2), 151–160, doi: 10.1016/j.canlet.2009.08.010 (2010).
25. Sun, S., Wang, Z. Head neck squamous cell carcinoma c-Met⁺ cells display cancer stem cell properties and are responsible for cisplatin-resistance and metastasis. *Int J Cancer.* 129 (10), 2337–2348, doi: 10.1002/ijc.25927 (2011).
26. Chen, Y.C., et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 385 (3), 307–313, doi: 10.1016/j.bbrc.2009.05.048. (2009).
27. Lim, Y.C., et al. Cancer stem cell traits in squamospheres derived from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 47 (2), 83–91, doi: 10.1016/j.oraloncology.2010.11.011 (2011).
28. Yu, Q., Stamenkovic, I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 14 (2), 163–176, doi:10.1101/gad.14.2.163 (2000).
29. Krishnamurthy, S., et al. Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res.* 70 (23), 9969–9978, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1712 (2010).
30. Chikamatsu, K., Takahashi, G., Sakakura, K., Ferrone, S., Masuyama, K. Immunoregulatory properties of CD44+ cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck.* 33 (2), 208–215, doi: 10.1002/hed.21420 (2011).
31. Chen, Y.W., et al. Cucurbitacin I suppressed stem-like property and enhanced radiation-induced apoptosis in head and neck squamous carcinoma--derived CD44(+)ALDH1(+) cells. *Mol Cancer Ther.* 9 (11), 2879–2892, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0504 (2010).
32. Clay, M.R., et al. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck.* 32 (9), 1195–1201, doi: 10.1002/hed.21315 (2010).
33. Meinelt, E., et al. Standardizing Application Setup Across Multiple Flow Cytometers Using BD FACSDiva Version 6 Software. *BD Biosciences Technical bulletin.* 1–16 (2012).
34. Zhou, L., Wei, X., Cheng, L., Tian, J., Jiang, J.J. CD133, one of the markers of cancer stem cells in Hep-2 cell line. *Laryngoscope.* 117 (3), 455–460, doi: 10.1097/01.mlg.0000251586.15299.35 (2007).
35. Fukusumi, T., et al. CD10 as a novel marker of therapeutic resistance and cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 111 (3), 506–514. doi: 10.1038/bjc.2014.289 (2014).

36. Shen, C., Xiang, M., Nie, C., Hu, H., Ma, Y., Wu, H. CD44 as a molecular marker to screen cancer stem cells in hypopharyngeal cancer. *Acta Otolaryngol.* 133 (11), 1219-1226. doi: 10.3109/00016489.2013.811750 (2013).
37. Kanojia, D., et al. Proteomic profiling of cancer stem cells derived from primary tumors of HER2/Neu transgenic mice. *Proteomics.* 12 (22), 3407-3415. doi: 10.1002/pmic.201200103 (2012).
38. Higgins, D.M., et al. Brain tumor stem cell multipotency correlates with nanog expression and extent of passaging in human glioblastoma xenografts. *Oncotarget.* 4 (5), 792-801, doi: 10.18632/oncotarget.1059 (2013).

FIGURES:

Figure 1:

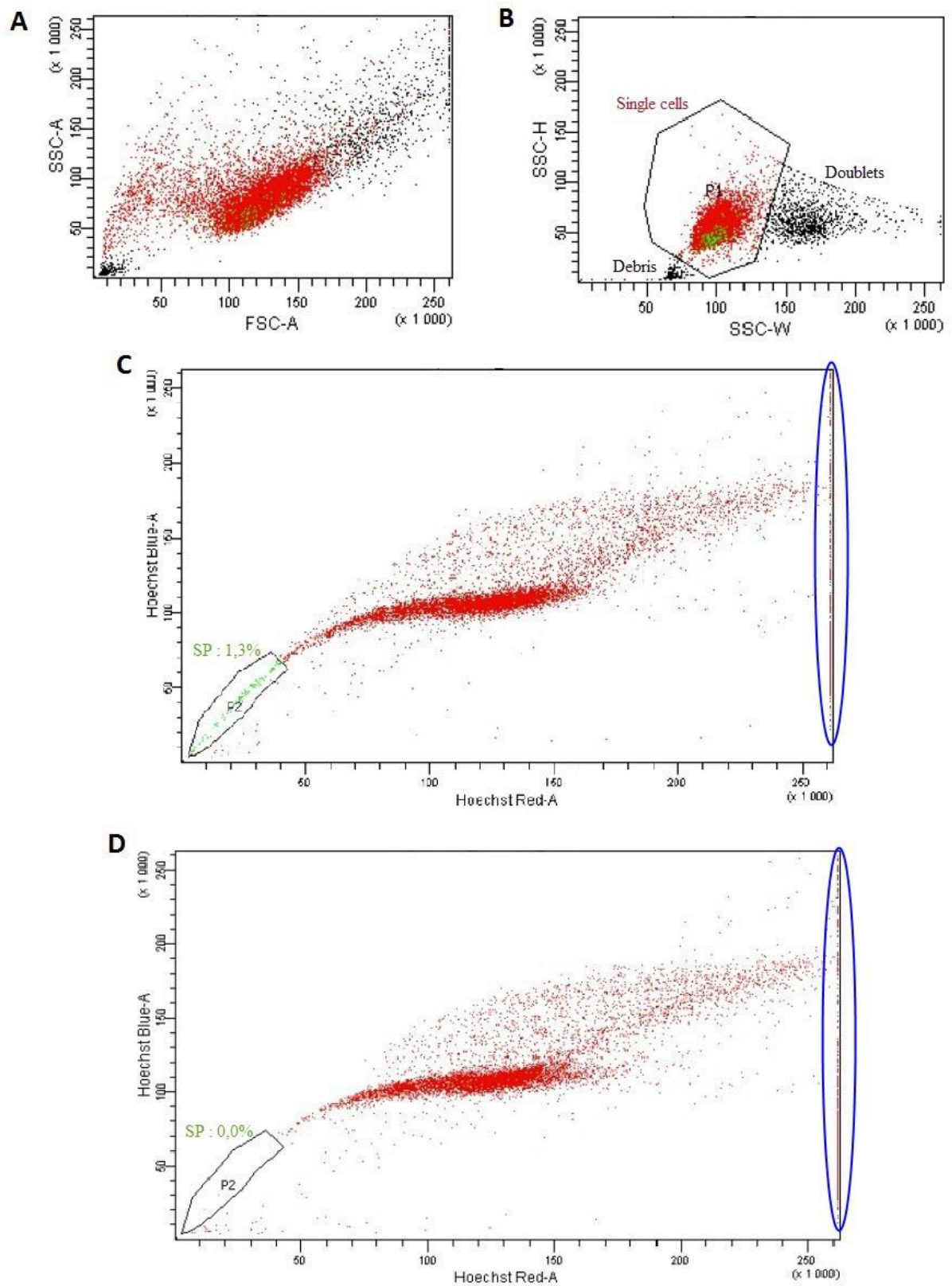
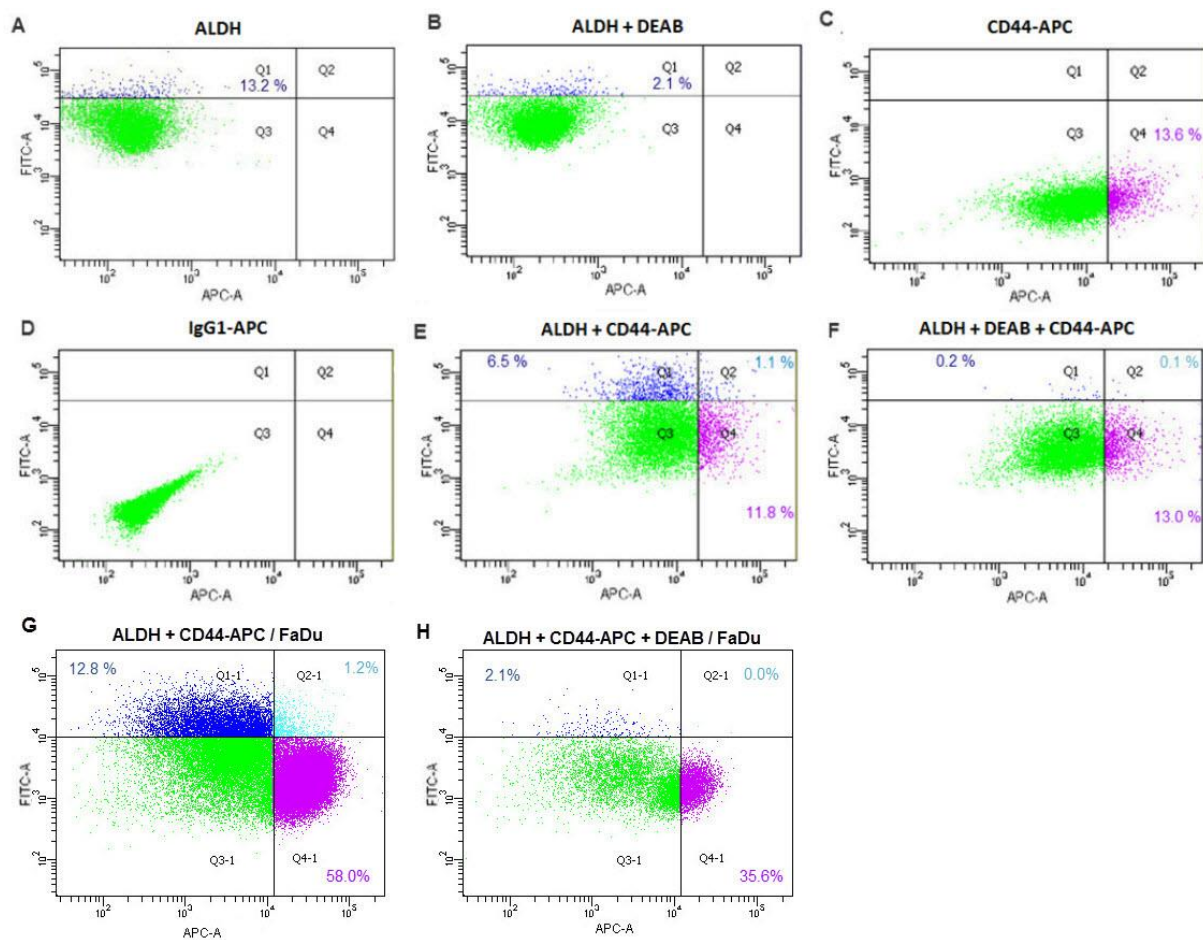
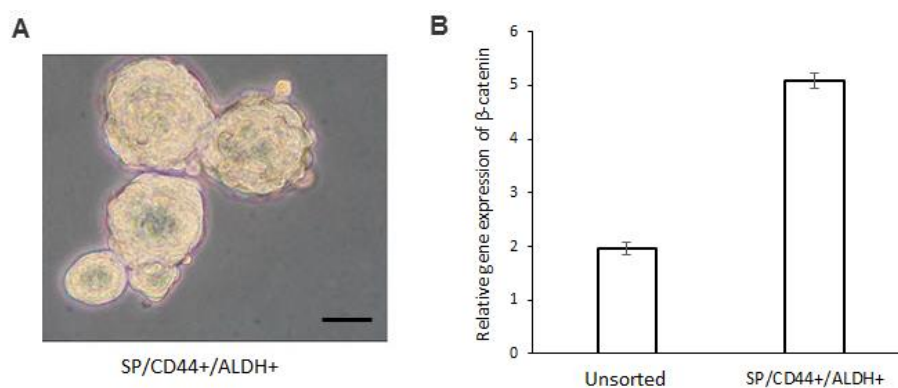


Figure 2:**Figure 3:****Table 1:**

Number of cells sorted	Culture flask type	Trypsin Volume (ml)	Culture Medium Volume (ml)
10 000 - 200 000	1 well of a 6-well plate or a 3.5 cm petri dish	0,5	2
200 000 - 1 000 000	1 T25 culture flask	1	4
> 1 000 000	1 T75 culture flask	2	10

Gilormini *et al.*, Oncotarget, soumis.

Preferential targeting of cancer stem cells in the radiosensitizing effect of ABT-737 on HNSCC.

Marion Gilormini^{1,2}, Céline Malesys^{1,2}, Emma Armandy^{1,2}, Patrick Manas³, Jean-Baptiste Guy^{1,2}, Nicolas Magné^{1,2,5}, Claire Rodriguez-Lafrasse^{1,2,4}, Dominique Ardail^{1,2,4}.

Authors' affiliations: ¹Université Lyon I, Faculté de Médecine-Lyon-Sud, Oullins, France; ²Laboratoire de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire, EMR3738, Oullins, France; ³UMS3444 BioSciences Gerland-Lyon Sud, PBES, Lyon, France; ⁴Hospices-Civils-de-Lyon, CHLS, Pierre-Bénite, France. ⁵ Institut de Cancérologie L. Neuwirth, St Etienne, France.

Corresponding author: Dominique Ardail. EMR3738 Laboratoire de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire, 165 chemin du grand Revoyet, BP12, 69921 Oullins, France. Tel: +33 4 26 23 59 09. Fax: +33 4 26 23 59 58. Email: dominique.ardail@univ-lyon1.fr.

Keywords: Head and neck squamous cell carcinoma, ABT-737, radiation, Bcl-2 family, cancer stem cells.

Abstract

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) are common human malignancies with poor clinical outcomes. The 5-year survival rates for patients with advanced stage HNSCC have not changed appreciably in the past few decades, underscoring a dire need for improved therapeutic options. HNSCC is frequently characterized by overexpression of anti-apoptotic Bcl-2 family members. Increased levels of these anti-apoptotic proteins have been associated with radio- and chemoresistance and poor clinical outcome. The aim of this study was to evaluate combined effects of radiation and ABT-737, a BH3-mimetic molecule, in HNSCC. Although ABT-737, as a single agent, was largely ineffective at promoting HNSCC cell death, we found that combining ABT-737 and radiation induced strong synergistic apoptosis in HNSCC cell lines and delayed tumoral growth *in vivo*. Moreover, we demonstrated for the first time that ABT-737, alone or in combination with radiation, can efficiently eliminate cancer stem cells (CSCs). Altogether, our results indicate that therapy targeting anti-apoptotic Bcl-2 family members could be a highly effective potential adjuvant to radiotherapy capable of targeting CSCs in HNSCC and therefore overcoming cancer recurrence and metastasis.

Introduction

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) are common human malignancies with poor clinical outcomes. The 5-year survival rates for patients with advanced stage HNSCC (TNM III-IV) have not changed appreciably in the past few decades, underscoring a dire need for improved therapeutic options. The major treatment options for HNSCC include surgery,

radiation, and chemotherapy, depending on the stage and location of the tumor. Unfortunately, the aggressive treatment strategies necessitated for advanced stage HNSCC are associated with cytotoxicity and approximately 50% of patients who are initially treated will suffer recurrence within 2 years [1,2] and expectation of cure is very limited. A key characteristic of advanced stage HNSCC is chemo- and radio-resistance resulting, in part, from aberrant overexpression of anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family which inhibit the intrinsic apoptosis pathway. A majority of HNSCC patients exhibit marked overexpression of Bcl-X_L [3] which has been shown to correlate with resistance to chemotherapy and radiotherapy and with poor clinical prognosis [4,5]. In order to inhibit Bcl-X_L expression or function, antisense oligonucleotides [6] or short peptides (that bind to Bcl-X_L and Bcl-2 [7]) have been developed and shown to promote apoptosis signaling and cell death in HNSCC cell lines. More recently, the highly selective Bcl-X_L/Bcl-2 inhibitor ABT-737 was shown to synergize with conventional chemotherapeutic drugs in killing HNSCC cells [8].

ABT-737 is a BH3-mimetic molecule that targets anti-apoptotic Bcl-2 family proteins (Bcl-2, Bcl-X_L) thereby preventing them from binding the apoptosis activators (Bid, Bim, Puma) or sensitizers (Bad, Noxa). The displacement of the activator from Bcl-2 or Bcl-X_L by ABT-737 promotes Bax and Bak oligomerization and programmed cell death of malignant cells [9]. ABT-737 was shown to potently act as a single-agent drug on a number of cell lines [10-12] but also markedly increase the response to multiple chemotherapy agents *in vitro* [9, 10-15]. ABT-737 also showed good activity as a single agent in two small cell lung cancer xenograft models [9] and delayed morbidity in lymphoid as well as certain epithelial tumors *in vivo* [16-18]. Some studies have also shown that ABT-737 can enhance the radiosensitivity of solid resistant tumors [19,20]. To our knowledge, there has been no prior study investigating the effect of ABT-737 in combination with radiotherapy for the treatment of HNSCC. Moreover, as cancer stem cells (CSCs) have been demonstrated to play a major role in local recurrence and metastatic spread in HNSCC [21], it appears that establishing innovative treatments targeting CSCs should be achieved in order to alleviate the morbidity and mortality of this pervasive disease. In the present study, we describe that ABT-737 combined with radiation synergistically induces apoptosis in HNSCC. We also describe the effects of ABT-737 on HNSCC stem cells and demonstrated a preferential cytotoxic activity towards these quiescent/slowly proliferating CSCs *in vitro* thus showing considerable promise to eradicate these therapy-resistant cells.

Results

Sensitivity of HNSCC cell lines to ABT 737

We first determined 50% inhibitory concentrations (IC₅₀) of ABT-737 in four HNSCC cell lines of graduate radiosensitivity (SF2 ranging from 0.39 to 0.76), defined as the dose of ABT 737 required to cause 50% loss in viability of cells at 48h. All the cell lines had IC₅₀ values ranging from 2 μ M to 14 μ M (Table 1). Moreover, a good correlation was obtained between the IC₅₀ of ABT-737 and the SF2 of the four cell lines ($R^2 = 0.861$) (Figure 1A). ABT-

737 was previously shown to potently trigger cell death in certain tumoral cell types whereas other cells are less sensitive, a difference related to the differential expression of members of the Bcl-2 family. To check this, Western blot analysis (Figure 1B) showed that all the cell lines expressed Bcl-X_L and at a lesser extend Bcl-2, two primary targets of ABT 737. Concerning CD44⁺ cells (cancer stem-like cells), we can notice an overexpression of Bcl-2 (+ 100%) and Bcl-X_L, at a lesser extend (+20%). In addition, they all express Mcl-1, a critical determinant for resistance to ABT-737, but at different levels. The sensitivity of our cell lines to ABT-737 suggests therefore that the Mcl-1 content is not high enough to inhibit ABT-737 effect. Considering the pro-apoptotic members of the Bcl-2 family, Bax is over-expressed when compared to Bak except for the SCC61 cell line. Interestingly, a good correlation was obtained between the Bak expression ($R^2 = 0.930$) (Figure 1C) and between the Bcl-X_L expression ($R^2 = 0.799$) (Figure 1D) of the HNSCC cell lines studied.

ABT 737 synergizes with irradiation to kill HNSCC cells

In order to determine whether ABT-737 potentiates the effect of radiation therapy in HNSCC, the percentage of cells in the sub-G1 phase was quantified. As shown in Figure 2A, treatment of cells with ABT-737 alone led to a modest increase of sub-G1 cells ranging from 5% to 20% at 72h, and 10% to 40% at 120h, depending on the cell line. Although exposure to radiation alone led to a greater (SQ20B, SCC61) or equivalent (Cal27, Cal33) increase of the percentage of cells in the sub-G1 phase compared to ABT-737 alone, the combination ABT-737 with radiation resulted in a significant enhancement of hypodiploid cells, whatever the cell line considered. In order to confirm the radiosensitizing effect of ABT-737, a clonogenic assay was performed with the most radioresistant cell line, SQ20B, taken as a reference. As depicted in Figure 2B, a decrease of the SF2 value from 0.81 to 0.60 was obtained after treatment with ABT-737. Moreover, isobolographic analyses of cell survival show that ABT-737 and radiation effects are always synergistic, whatever the final level of cytotoxic efficiency (50 and 10% survival) and the applied dose of radiation ranging from 2 to 5 Gy (Supplemental data 1). At the minimal dose of applied radiation (1 Gy), ABT-737 and radiation are additive at 50 and 10% survival efficiency.

ABT-737 combined with irradiation activates apoptotic cell death

To confirm that the synergistic effect of ABT-737 and irradiation triggers apoptotic cell death, flow cytometry experiments were performed. Figure 3A shows that TUNEL-positive cells increased with time from 72h after irradiation. Although no activation of apoptosis occurred with ABT-737 alone, a significant enhancement was obtained after the combined treatment (from 12 to 30% of positive cells at 72h and 25 to 58% at 120h). Similar results were obtained with total caspases activity measurement (Figure 3B) and specific activation of caspase-3 (Figure 3C). All these results confirmed those obtained after the analysis of the sub-G1 peak described above.

Given the fact that mitochondria represent the preferential cellular location of Bcl-2 and Bcl-X_L, two targets of ABT-737, and the hub of apoptosis-related events [22], we examined if ABT-737 combined with irradiation could trigger an intra-mitochondrial oxidative stress. The

specific dye MitoSOX that can penetrate live cells was used to visualize (Figure 3D) and quantitate (Figure 3E) the production of superoxide anions by mitochondria [23]. After checking the specificity of the MitoSOX labeling with antimycin A, flow-cytometry analysis show that ABT-737 resulted in a significant and sustained increase of MitoSOX fluorescence from 16 h after treatment (Figure 3E) whereas radiation reinforced the effect of ABT-737 only 24h after the combined treatment. Additional flow-cytometric analysis of JC-1-stained SQ20B cells (Fig 3F) revealed that the combined treatment led to the loss of mitochondrial transmembrane potential in a time-dependent manner, from 48h after treatment. All these results demonstrate that the combination ABT-737-irradiation radiosensitize SQ20B cells through triggering of the intrinsic apoptotic pathway.

ABT-737 combined with irradiation alters expression levels of Bcl-2 family members

We next investigated the synergistic effect of ABT-737/radiation on the expression levels of Bcl-2 family members (Figure 4). Treatment with ABT-737 alone did not substantially alter the level of the pro-apoptotic protein Bax but did cause a modest increase of the anti-apoptotic proteins Bcl-2, Bcl-X_L and Mcl-1, more importantly with respect to the protein Noxa. By contrast, a striking up-regulation of Bak was obtained with ABT-737 alone. Only Bcl-X_L and Noxa protein levels exhibited changes in response to radiation alone. Treatment combining ABT-737 with radiation resulted in consistent up-regulation of Bcl-X_L and Mcl-1 compared with ABT-737 alone. Regarding Noxa, radiation strongly enhanced (+ 105 %) its expression relative to control cells while treatment with ABT-737 alone resulted in a more modest increase (+ 59 %). A cumulative effect on Noxa expression was obtained (+ 190 %) after the combined treatment. Thus, these data suggest that radiation induces an overexpression of Noxa which could inactivate Mcl-1 and make them sensitive to ABT-737.

ABT-737 dramatically increases cell death in the cancer stem cells sub-population

In order to overcome radioresistance and potential relapse of HNSCC, we next investigated the efficiency of ABT-737 combined with photon exposure on a sub-population of cells (SP⁺/CD44^{high}/ALDH^{high}) isolated from the parental SQ20B cell line whose cancer stem cells properties have been described in details elsewhere [24]. As depicted in Figure 5A, the treatment of SP⁺/CD44^{high}/ALDH^{high} cells with ABT-737 alone resulted in an increase of the percentage of cells in the sub-G1 phase with respect to time (from 15% at 24h up to 79% at 120h). Surprisingly, only a very small additional increase was obtained when ABT-737 was combined with radiation therapy (15 to 19% at 24 h and 79 to 90% at 120h). If these results are compared with those obtained in the parental SQ20B cell line, we can notice the high efficiency of ABT-737 against SP⁺/CD44^{high}/ALDH^{high} cells (79% of the cells in the sub-G1 phase compared to 10% obtained in the parental cell line). Next, the involvement of mitochondria in the triggering of SP⁺/CD44^{high}/ALDH^{high} cell death was checked by the measurement of $\Delta\psi_m$ loss. Figure 5B shows that in more than 47% of these cells, mitochondria are affected at 24h up to 75% at 120h. As reported, no significant additional increase is obtained when ABT-737 is used in combination with radiation. These results are very promising because they demonstrate that ABT-737 is a potent cell death inducer, particularly effective against HNSCC cancer stem cells. By comparison, while 63% of parental SQ20B cell line died after ABT-737 and

irradiation, 89% of SP⁺/CD44^{high}/ALDH^{high} cell death is obtained under the same experimental conditions. SP⁺/CD44^{high}/ALDH^{high} cells are thus more susceptible to ABT-737-induced apoptosis than the parental cell line. Considering the expression levels of Bcl-2 family members in SP⁺/CD44^{high}/ALDH^{high} cells (Figure 5C), a small increased expression of all the members (except Bak and PUMA) of the Bcl-2 family is observed at 7h but only Noxa is considerably increased even after treatment with ABT-737 alone (180%).

ABT-737 combined with ionizing radiation delays the tumoral growth *in vivo*

To investigate whether ABT-737 could reverse acquired radioresistance of HNSCC *in vivo*, we used a heterotopic xenograft tumor model in nude mice. As shown in Figure 6, the tumors treated with ionizing radiation grew at a slower rate than those of the control group just after the week of treatment, but re-grew rapidly a few weeks after. Interestingly, the treatment with ABT-737 alone seems to have a more pronounced delayed effect. Finally, the tumors in the ABT-737 plus radiation group grew like the ABT-737 group until 30 days, and more slowly thereafter. Taken together, these results suggest that ABT-737 has a similar effect as irradiation on SQ20B xenograft tumor growth whereas the combination ABT737 + irradiation is much more effective than ABT-737 or radiation alone.

Discussion

Developing effective strategies to circumvent HNSCC resistance and to improve clinical outcome has proven to be a challenging task. In this report, we show the synergistic effect of ABT-737, an inhibitor of anti-apoptotic Bcl-2 proteins, with radiation therapy which results in the radio-sensitization of HNSCC cell lines, including CSCs *in vitro*, and *in vivo* in a HNSCC xenograft model. This study also demonstrate that ABT7-37, alone or in combination with radiation therapy, showed a preferential cytotoxicity towards HNSCC CSCs, which is a promising approach to reduce cancer relapse and metastasis.

ABT-737 binds Bcl-2 and Bcl-X_L with high affinity and has shown single-agent efficacy against multiple cell lines as well as in combination with standard therapy in human leukemia and multiple myeloma models [3, 25], lymphoma [26], melanoma [13], cholangiocarcinoma [14] or HNSCC [8]. Except some reports on Hela cells [27], non-small-cell-lung cancer cells [19] and breast cancer cells [20, 28], no more data are available on a synergistic effect of BH3-mimetics with radiation, especially on HNSCC. Therefore, we first evaluated ABT-737 efficacy in a panel of four HNSCC cell lines of graduate radio-sensitivity and observed a correspondingly range of sensitivity to ABT-737 *in vitro*. All the cell lines used in this report expressed Bcl-2, Bcl-X_L and Mcl-1 at different levels. Although no significant correlation between the expression of each anti-apoptotic protein of the Bcl-2 family and their sensitivity to ABT-737 and/or individual cell line radio-sensitivity could be identified, a positive correlation between their individual radio-sensitivity and their sensitivity to ABT-737 was obtained. It is now well documented that there is no single determinant of cell sensitivity to ABT-737 [29] and the expression of Bcl-2 or Bcl-X_L is a necessary but not a sufficient condition to confer drug sensitivity [30]. As an example, Mcl-1 confers resistance to ABT-737 because of the poor affinity of this drug for Mcl-1. Silencing Mcl-1 by RNA interference increases the

sensitivity to ABT-737 [31, 32] while ectopic expression of Mcl-1 can render cells resistant to ABT-737 [33]. As emphasized by our results, expression of Mcl-1 in our cell lines is not sufficient to cause resistance to ABT-737 thus suggesting that complex interactions rather than simply the expression pattern of Bcl-2 proteins plays a role in determining the sensitivity of Mcl-1-expressing cells to ABT-737 [34]. Furthermore, exposure of SQ20B cells to ABT-737, alone or in combination with radiation, was in contrast found to up-regulate Mcl-1 expression, a result that was previously reported in lymphoma and breast cancer cells [35, 36].

Interestingly, a good correlation was found between pro-apoptotic Bak expression and radio-sensitivity in the four HNSCC cell lines but not between Bak and Bax expression. Although the significance of this finding should be explored in the future, a prognostic value of Bak expression in oral tongue squamous cell carcinoma had already been reported [37].

Despite the fact that the resistance, either to chemotherapy and radiotherapy, of HNSCC cells is due in part to the expression of anti-apoptotic members of the Bcl-2 protein family, including Bcl-X_L and Bcl-2 at a lesser extent, the sensitivity of HNSCC to ABT-737, in synergy with cisplatin and etoposide, has only been reported in one work [8]. As no data are available about using ABT-737 with radiation to date, we demonstrate for the first time, here, the high efficiency of this synergistic combination in HNSCC. Taking the most radio-resistant cell line (SQ20B) as a reference, we also show that the combination of ABT-737 with radiation markedly enhanced the sensitivity to radiation through the induction of intrinsic apoptotic cell death. Although ABT-737 alone was unable to significantly trigger apoptosis, radiation causes apoptosis occurrence, assessed by total caspases activity and DNA fragmentation, but remained relatively low. Used in combination, ABT-737 and radiation work synergistically, as assessed by dramatic increase in mitochondrial membrane depolarization, caspase-3 activation and DNA fragmentation.

Our studies also reveal that Noxa expression was markedly up-regulated after treatment with ABT-737 plus radiotherapy. Similar up-regulation of Noxa by ABT-737 plus chemotherapy has been already observed in melanoma cells [13], colorectal cancer cells [38], ovarian carcinoma cells [39] and H196 SCLC cells that are highly resistant to ABT-737 alone [18], thus conferring sensitivity of the cells to this drug.

It is noteworthy that Noxa is known to bind with high affinity to Mcl-1, but not Bcl-X_L or Bcl-2 [40]. This suggests that in our cellular model, Noxa up-regulation should functionally inactivate Mcl-1, causing displacement of pro-apoptotic proteins, such as Bak, bound to the Mcl-1 protein and promoting synergism by this combination. Moreover, it was recently demonstrated [41] a direct interaction between Noxa and either Bax or Bak during apoptosis induction thus supporting the role of Noxa as a potential activator of both Bax and Bak. Noxa has also been previously suggested [42] to be activated in response to γ -radiation in a p53-dependent as well as –independent manner. Thus, in HNSCC cells, repression of cellular Mcl-1 via Noxa up-regulation by ABT-737 alone or radiation alone may explain their highly potent synergism in promoting, for example, a Bak-dependent cell death.

Poor survival rates and treatment failures are common features in the management of advanced stage diseases of HNSCC. The initiation, growth, recurrence, and metastasis of HNSCC and other cancers have recently been related to the presence of CSCs, a subpopulation which displays the ability to undergo self-renewal and differentiation and hence have the ability to initiate tumorigenesis and support ongoing tumor growth [43]. Therefore, targeted

elimination of CSC has been considered a new conceptual framework for head and neck cancer treatment [44,45]. Although it has been proposed that targeting self-renewal pathways in CSCs, such as the Wnt, Notch, and Hedgehog pathways [46], or specific CSC markers, such as CD133 (Prominin-1) [47], CXCR1 [48,49], and CD44 [50], may offer therapeutic benefits to cancer therapy, evidence for the benefits of blocking these pathways and markers in HNSCC has not been reported so far. However, recent data offer a preclinical proof-of-concept for targeting the c-Met/FZD8 signalling axis as a CSC-directed therapy to improve HNSCC treatment [51]. Furthermore, inhibition of Rac 1 expression and signalling was shown to interrupt metastatic process due to anoikis restoration and decrease of cell migration [52]. Several studies have also focused on manipulating the apoptotic machinery to eradicate tumour-initiating cells, either by intervening in the extrinsic or intrinsic pathways [53] through the use of XIAP inhibitors [54] or down-regulation of cFLIP [55]. In this paper, we demonstrated for the first time that ABT-737, alone or in combination with radiation, exhibited a powerful and preferential cytotoxic activity towards HNSCC stem cells. This can be explained by the simple observation of Bcl-2 overexpression in CSCs (see Figure 1). Our data could therefore argue for a Bcl-2-dependent anti-apoptotic threshold in HNSCC CSC. In accordance with our data, a preferential elimination of CSC after Bcl-2 family proteins-targeted strategies was recently demonstrated in other models such as leukemia stem cells [56, 57] and non-small cell lung cancer [58].

Although it was demonstrated that anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family display regulatory functions on migration as well as invasiveness of colorectal cancer cells [59], it occurred independently of their anti-apoptotic effects. Future studies are therefore needed to explain how ABT-737 can both trigger HNSCC stem cells death and to impair their migration and invasion.

Finally, owing to its ability to preferentially kill HNSCC stem cells, ABT-737 treatment, in association with radiation, may not result in a fast macroscopic reduction of tumour size but may have long-term beneficial effects on the rates of tumour growth and relapse. Clinical trials designed to specifically evaluate this endpoint will help to clarify the usefulness of inhibition of Bcl-2 family pro-apoptotic members in the treatment of HNSCC.

Conclusion: Based on the data of our study, we conclude that the combination of ABT-737 with radiation triggers the caspase-dependent mitochondrial apoptosis in HNSCC. Moreover, owing to its ability to preferentially kill HNSCC stem cells, this combined therapy is expected to significantly circumvent HNSCC resistance and reduce cancer relapse and metastasis.

Materials and Methods

Cell culture

Four human-derived HNSCC cell lines (SQ20B, SCC61, Cal27 and Cal33) were used and cultured in a 5% CO₂ atmosphere. SQ20B and SCC61 were obtained from John Little Laboratory (Harvard School of Public Health, Boston, USA); Cal27 and Cal 33 were obtained from G. Milano (Dept of Oncopharmacology, Centre A. Lacassagne, Nice, France). The SQ20B cell line is derived from a larynx epidermoid carcinoma; the SCC61, Cal27 and Cal33 cell lines are derived from tongue squamous carcinomas. SQ20B and SCC61 cell lines were cultured in

Dulbecco's modified Eagle's medium containing 4.5 g/L of glucose supplemented by 10 % of fetal calf serum (FCS), 0.04 mg/l of hydrocortisone, 100 U/ml of penicillin and 0.1 g/L of streptomycin. Cal27 and Cal33 were cultured into the same medium but without hydrocortisone.

Cancer stem cells isolation

Flow cytometry sorting for Hoechst efflux

The protocol used was previously described by Bertrand *et al.* [24]. Briefly, the SQ20B cell line is trypsinized and incubated with Hoechst 33342 dye (Sigma-Aldrich) at 25 µg/l during 90 min at 37°C. Cells are then washed with PBS and re-suspended at a concentration of 10⁷ cells/ml in PBS. Hoechst efflux, distinctive of side population (SP) cells, is measured with a FACS-LSRII (BD Biosciences, excitation: 355 nm, emission: blue: 450 nm, red: 675 nm). Simultaneously, a negative control is prepared under the same experimental conditions by adding 50 mM Verapamil, an inhibitor of ABC carriers. This control must show a disappearance of the SP cluster. After sorting, SP cells are transferred in a flask and maintained at 37°C in a 5 % CO₂ atmosphere.

Expression of CD44 and ALDH by flow cytometry

SP cells are labeled with a CD44 antibody and ALDH detection kit (Aldefluor™ kit, StemCell, 01700) in order to select the CD44^{high}/ALDH^{high} sub-population. Briefly, cells are trypsinized, washed with PBS and re-suspended into Aldefluor buffer. Cells are then incubated with Aldefluor reagent 45 minutes at 37°C. After a wash, cells are incubated for 10 min at 4°C with an anti-CD44-APC mouse monoclonal antibody (1/1 000, Miltenyi Biotec), washed in PBS and sorted with a FACS-LSRII flow cytometer (BD Biosciences). Thereafter, sorted cells are cultured at 37°C in a 5 % CO₂ atmosphere.

ABT-737 treatment

ABT-737 (Abbott Laboratories, Illinois) was dissolved into Dimethylsulfoxide (DMSO) at a concentration of 10 mM. Cells were seeded and treated 8 hours after. Control cells were treated in parallel with 0.1 % of DMSO.

Irradiation procedures

Cell monolayers were irradiated in a X-rad 320 irradiator (PXI, North Brandford, CT) at a dose rate of 2 Gy/min, an energy of 250 kV and an intensity of 15 mA. Cell irradiations were realized 20 hours after the treatment by ABT-737 or DMSO.

Cell growth measurement

72 hours after irradiation, cells were fixed with 96 % ethanol and colored with a Cristal Violet solution (0.1 % in 20 mM HEPES, pH 6). Next, colored cells were lysed with a 1 % SDS solution and the absorbance was measured at 560 nm.

Western blot analysis

Cell monolayers were trypsinized and lysed with a cold lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 % Triton X-100) containing protease and phosphatase inhibitors (Roche). After 30 min incubation on ice, lysates were centrifuged at 15 000 g for 20 min. The total protein concentration in the lysates was measured using the bicinchoninic acid (BCA) assay (Sigma-Aldrich). The antibodies used were : anti-caspase-3 (Cell Signalling, 9662), anti-Bcl-2 (Santa Cruz, sc-509), anti-Bcl-X_L (Cell Signaling, 2762), anti-Mcl-1 (Santa Cruz, sc-819), anti-Bax (Santa Cruz, sc-493), anti-Bak (Cell Signaling, 3814), anti-PUMA (Cell Signaling, 4976), anti-Noxa (Enzo Life Sciences, ALX-804-408), anti- α -tubulin (Santa Cruz, sc-8035) and anti-GAPDH (Biodesign, H-86-504M). Equal protein loading was confirmed with α -tubulin or GAPDH expression. Relative protein quantification was done with Image Gauge Fujifilm software (Fuji).

Analysis of clonogenic cell survival

Cell lines were seeded in 25 cm² flasks at different cell densities depending on the dose of radiation applied. Cells were treated with 10 μ M ABT-737 for 7 hours after seeding and irradiated 13 hours after treatment at doses varying from 0 to 5 Gy. Cell survival was assessed by the standard colony formation assay as described by Beuve *et al.* [60]

Cell Cycle analysis

Cells were fixed with 70 % ethanol and 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining was used at 1 μ g/mL to analyze the cell cycle distribution using a FACScan flow cytometer (BD LSRII flow cytometer, BD Biosciences).

TUNEL Assay

Apoptosis was assayed with the DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega, G3250). Briefly, cells were fixed with 1 % paraformaldehyde in PBS for 20 minutes on ice and then permeabilized with 70 % ethanol for 4 hours minimum at -20 °C. Cells were then incubated with the reaction mixture for 1 hour at 37 °C. After washing with PBS, cells were stained with 5 μ g/ml PI containing 0.5 mg/ml DNase-free RNase A for 30 minutes at room temperature and analyzed using the FACScan flow cytometer at an excitation wavelength of 520 nm and an emission wavelength of 600 nm.

Activated Caspases Assay

CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker (Promega, G7462) was used to quantify activated caspases. Following trypsination, the inhibitor is added and incubated for 20 minutes at room temperature. After washing with PBS, cells are resuspended in PBS and analyzed using

the FACScan flow cytometer at an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 530 nm.

Mitochondrial membrane potential measurement

The mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was measured with the JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) dye (Sigma-Aldrich, T4069). After trypsinization of the cells, the JC-1 dye is added at a concentration of 5 $\mu\text{g/ml}$ and incubated for 20 minutes at 37 °C. Then, cells are analyzed using the FACScan flow cytometer at an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 525 nm.

Total Reactive Oxygen Species formation assay

Total Reactive Oxygen Species (ROS) were measured through dihydroethidium (DHE, Sigma-Aldrich, D7008) oxidation. After trypsinization of the cells, 4 μM DHE is added in PBS and incubated for 10 minutes at 37°C. The reaction is stopped by transferring tubes on ice. Then, cells are analyzed using the FACScan flow cytometer at an excitation wavelength of 520 nm and an emission wavelength of 600 nm.

MitoSOX™ Red (mitochondrial superoxide indicator) assay

Before treatment with Antimycin A, cells are incubated with 50 nM MitoTracker® Green FM (Invitrogen, M7514) diluted into Hank's Balance Salt Solution (HBSS) buffer containing calcium and magnesium (Gibco) for 30 min at 37°C. Cells are then washed with HBSS buffer and treated with 10 μM Antimycin A (Sigma-Aldrich, A8674-25MG). After washing in HBSS buffer, cells are treated with 5 μM MitoSOX (Molecular Probes, Carlsbad, CA, M36008) for 30 min at 37°C. Then cells are washed with HBSS buffer and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 min at room temperature and are stained with 1 mg/l DAPI for 10 min at room temperature. Labeled cells are visualized by fluorescence microscopy (Axio Imager Z2, Zeiss). Alternatively, results can also be analyzed by flow cytometry after staining for 30 min with 5 μM MitoSOX before analysis. Thereafter, cells are trypsinized and fluorescence intensity is measured by flow cytometry at an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 575 nm (LSR III, BD Biosciences).

***In vivo* study**

The *in vivo* study protocol (number 00746.02) was accepted by the ethics committee of the Claude Bernard Lyon 1 University, the CECCAPP. We used 6-week-old females NODE-SCID mice (Charles River Laboratory, L'Arbresle, France). 3×10^6 SQ20B cells were injected subcutaneously in the intern face of the left leg of the mice under isoflurane anesthesia. 3 weeks after the xenograft, mice were randomized (see Supplementary data 1) into 4 groups in order to be treated as follows: the control group (n = 11), the ABT-737 group (n=11), the 10 Gy group (n = 8) and the ABT-737 + 10 Gy group (n=7). The control group was treated by 2% DMSO in physiological serum injected intra-peritoneally. The ABT-737 group was treated as the same, with 20 mg/kg ABT-737 diluted in physiological serum. The 10 Gy group was first treated with 2 % DMSO in physiological serum injected intraperitoneally, and the tumor was irradiated at 2

Gy by day. Finally, the ABT-737 + 10 Gy group was treated with 20 mg/kg ABT-737 in physiological serum, injected intraperitoneally, and the tumor was irradiated at 2 Gy by day. These treatments were realized every day during 5 consecutive days. During the week of treatment, mice were weighted every day and twice a week after treatment (mice were sacrificed if 10% of the starting weight was lost) together with the size and aspect of the tumor (mice were sacrificed if the tumoral volume exceeded 1 200 cm³ or if the tumor was necrotic).

Statistical analysis

Dose-response interactions between radiation and ABT-737 were evaluated using the classical isobolographic method described by Steel and Peckham [61]. The theoretical basis and procedure of the isobologram method have been described in detail [62]. The coordinates of the experimental point are the ABT-737 concentration and the radiation dose which, when combined, give the level of efficacy. For a given level of efficacy (% survival) an “envelope of additivity” curve was calculated from the dose effect curves of ABT-737 combined to irradiation (5 doses) and from the dose-effect curves of radiation alone (5 doses). If the experimental point falls above, beyond or under the limits of the “envelope of additivity”, ABT-737 and radiation combination give rise to antagonistic (Ant), additive (+) or synergistic (Syn) effects, respectively.

Each experiment was realized in triplicates. Statistical analysis was realized with the Student's t test. Significant results have a p value < 0.05 (*), < 0.01 (**) or < 0.001 (***).

Acknowledgments: This work was supported by the Contrat-Plan-Etat-Region. We acknowledge G. Alphonse for irradiation support. We would also like to acknowledge the flow cytometry platform of UFR BioSciences Gerland-Lyon-Sud (UMS3444/ US8) for their contribution and PBES (Ecole Normale Supérieure de Lyon, France) for animal care.

Potential conflict of interest: none

References

1. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet*. 2008; 371: 1695-1709.
2. Clark J, Li W, Smith G, Shannon K, Clifford A, McNeil E, Gao K, Jackson M, Mo Tin M, O'Brien C. Outcome of treatment for advanced cervical metastatic squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2005; 27: 87–94.
3. Trask DK, Wolf GT, Bradford CR, Fisher SG, Devaney K, Johnson M, Singleton T, Wicha M. Expression of Bcl-2 family proteins in advanced laryngeal squamous cell carcinoma: correlation with response to chemotherapy and organ preservation. *Laryngoscope*. 2002; 112: 638–644.

4. Pena JC, Thompson CB, Recant W, Vokes EE, Rudin CM. Bcl-xL and Bcl-2 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*. 1999; 85: 164–170.
5. Homma A, Furuta Y, Oridate N, Nakano Y, Kohashi G, Yagi K, Nagahashi T, Yagi K, Nagahashi T, Fukuda S, Inoue K, Inuyama Y. Prognostic significance of clinical parameters and biological markers in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck treated with concurrent chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res*. 1995; 5: 801–806.
6. Sharma H, Sen S, Lo Muzio L, Mariggiò A, Singh N. Antisense-mediated downregulation of anti-apoptotic proteins induces apoptosis and sensitizes head and neck squamous cell carcinoma cells to chemotherapy. *Cancer Biol Ther*. 2005; 4: 720–727.
7. Li R, Boehm AL, Miranda MB, Shangary S, Grandis JR, Johnson DE. Targeting antiapoptotic Bcl-2 family members with cell-permeable BH3 peptides induces apoptosis signaling and death in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Neoplasia*. 2007; 9: 801–811.
8. Li R, Zang Y, Li C, Patel NS, Grandis JR, Johnson DE. ABT-737 synergizes with chemotherapy to kill head and neck squamous cell carcinoma cells via a Noxa-mediated pathway. *Mol Pharmacol*. 2009; 75: 1231–1239.
9. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, Bruncko M, Deckwerth TL, Dinges J, Hajduk PJ, Joseph MK, Kitada S, Korsmeyer SJ, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*. 2005; 435: 677–681.
10. Kline MP, Rajkumar SV, Timm MM, Kimlinger TK, Haug JL, Lust JA, Greipp PR, Kumar S. ABT-737, an inhibitor of Bcl-2 family proteins, is a potent inducer of apoptosis in multiple myeloma cells. *Leukemia*. 2007; 21: 1549–1560.
11. Allaman-Pillet N, Oberson A, Munier F, Daniel F, Schorderet DF. The Bcl-2/Bcl-XL inhibitor ABT-737 promotes death of retinoblastoma cancer cells. *Ophthalmic Genetics*. 2013; 34: 1-13.
12. Tagscherer KE, Fassl A, Campos B, Farhadi M, Kraemer A, Böck BC, Macher-Goeppinger S, Radlwimmer B, Wiestler OD, Herold-Mende C, Roth W. Apoptosis-based treatment of glioblastomas with ABT-737, a novel small molecule inhibitor of Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 2008; 27: 6646-6656.
13. Reuland SN, Goldstein NB, Partyka KA, Cooper DA, Fujita M, Norris DA, Shellman YG. The Combination of BH3-Mimetic ABT-737 with the Alkylating Agent Temozolomide Induces Strong Synergistic Killing of Melanoma Cells Independent of p53. *PLoS One*. 2011; 6: e24294.
14. Romani AA, Desenzani S, Morganti MM, Baroni MC, Borghetti AF, Soliani P. The BH3-mimetic ABT-737 targets the apoptotic machinery in cholangiocarcinoma cell lines resulting in synergistic interactions with zoledronic acid. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011; 67: 557–567.
15. Hikita H, Takehara T, Shimizu S, Kodama T et al. The Bcl-xL Inhibitor, ABT-737, Efficiently Induces Apoptosis and Suppresses Growth of Hepatoma Cells in Combination with Sorafenib. *Hepatology*. 2010; 52 : 1310-1321.
16. van Delft MF, Wei AH, Mason KD, Vandenberg CJ, Chen L, Czabotar PE, Willis SN, Scott CL, Day CL, Cory S, Adams JM, Roberts AW, Huang DC. The BH3 mimetic ABT-

- 737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/ Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell*. 2006; 10: 389–399.
17. Konopleva M, Contractor R, Tsao T, Samudio I, Ruvolo PP, Kitada S, Deng X, Zhai D, Shi YX, Sneed T, Verhaegen M, Soengas M, Ruvolo VR, et al. Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2006; 10: 375–388.
 18. Tahir SK, Yang X, Anderson MG, Morgan-Lappe SE, Sarthy AV, Chen J, Warner RB, Ng SC, Fesik SW, Elmore SW, Rosenberg SH, Tse C. Influence of Bcl-2 family members on the cellular response of small-cell lung cancer cell lines to ABT-737. *Cancer Res*. 2007; 67: 1176–1183.
 19. Kim KW, Moretti L, Mitchell LR, Jung DK, Lu B. Combined Bcl-2/mammalian target of rapamycin inhibition leads to enhanced radiosensitization via induction of apoptosis and autophagy in non-small cell lung tumor xenograft model. *Clin Cancer Res*. 2009, 15: 6096–6105.
 20. Li JY, Li YY, Jin W, Yang Q, Shao ZM, Tian XS. ABT-737 reverses the acquired radioresistance of breast cancer cells by targeting Bcl-2 and Bcl-xL. *J Exp Clin Cancer Res*. 2012; 31: 102-110.
 21. Routray S, Mohanty N. Cancer stem cells accountability in progression of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: the most recent trends! *Mol Biol Int*. 2014; 2014: 375325.
 22. Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell* 2011; 21: 92–101.
 23. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Yoshihiro K, Haskó G, Pacher P. Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 358: 203-208.
 24. Bertrand G, Maalouf M, Boivin A, Battiston-Montagne P, Beuve M, Levy A, Jalade P, Fournier C, Ardail D, Magné N, Alphonse G, Rodriguez-Lafrasse C. Targeting head and neck cancer stem cells to overcome resistance to photon and carbon ion radiation. *Stem Cell Rev*. 2014; 10: 114-126.
 25. Dariushnejad H, Zarghami N, Rahmati M, Ghasemali S, Sadeghi Z, Davoodi Z, Jafari Tekab H, Gandomkar Ghalhar M. ABT-737, Synergistically Enhances Daunorubicin-Mediated Apoptosis in Acute Myeloid Leukemia Cell Lines. *Adv Pharm Bull*. 2014; 4: 185-189.
 26. Yamaguchi R, Janssen E, Perkins G, Ellisman M, Kitada S, Reed JC. Efficient elimination of cancer cells by deoxyglucose-ABT-263/737 combination therapy. *PLoS One*. 2011; 6: e24102.
 27. Wang H, Yang YB, Shen HM, Gu J, Li T, Li XM. ABT-737 induces Bim expression via JNK signaling pathway and its effect on the radiation sensitivity of HeLa cells. *PLoS One*. 2012; 7: e52483.
 28. Wu H, Schiff DS, Lin Y, Neboori HJ, Goyal S, Feng Z, Haffty BG. Ionizing radiation sensitizes breast cancer cells to Bcl-2 inhibitor, ABT-737, through regulating Mcl-1. *Radiat Res*. 2014; 182: 618-625.
 29. Stamelos VA, Redman CW, Richardson A. Understanding sensitivity to BH3 mimetics: ABT-737 as a case study to foresee the complexities of personalized medicine. *J Mol Signal*. 2012; 7: 12.

30. Goldsmith KC, Lestini BJ, Gross M, Ip L, Bhumbra A, Zhang X, Zhao H, Liu X, Hogarty MD. BH3 response profiles from neuroblastoma mitochondria predict activity of small molecule Bcl-2 family antagonists. *Cell Death Differ.* 2010; 17: 872–882.
31. Keuling AM, Felton KE, Parker AA, Akbari M, Andrew SE, Tron VA. RNA silencing of Mcl-1 enhances ABT-737-mediated apoptosis in melanoma: role for a caspase-8-dependent pathway. *PLoS One.* 2009; 4: e6651.
32. Lestini BJ, Goldsmith KC, Fluchel MN, Liu X, Chen NL, Goyal B, Pawel BR, Hogarty MD. Mcl1 downregulation sensitizes neuroblastoma to cytotoxic chemotherapy and small molecule Bcl2-family antagonists. *Cancer Biol Ther.* 2009; 8: 1587-1595.
33. Chen S, Dai Y, Harada H, Dent P, Grant S. Mcl-1 down-regulation potentiates ABT-737 lethality by cooperatively inducing Bak activation and Bax translocation. *Cancer Res.* 2007; 67: 782–791.
34. Morales AA, Kurtoglu M, Matulis SM, Liu J, Siefker D, Gutman DM, Kaufman JL, Lee KP, Lonial S, Boise LH. Distribution of Bim determines Mcl-1 dependence or codependence with Bcl-xL/Bcl-2 in Mcl-1-expressing myeloma cells. *Blood.* 2011; 118: 1329–1339.
35. Zheng L, Yang W, Zhang C, Ding WJ, Zhu H, Lin NM, Wu HH, He QJ, Yang B. GDC-0941 sensitizes breast cancer to ABT-737 in vitro and in vivo through promoting the degradation of Mcl-1. *Cancer Lett.* 2011; 309: 27–36.
36. Yecies D, Carlson NE, Deng J, Letai A. Acquired resistance to ABT-737 in lymphoma cells that up-regulate MCL-1 and BFL-1. *Blood.* 2010; 115: 3304–3313.
37. Xie X, Clausen OP, Boysen M. Prognostic value of Bak expression in oral tongue squamous cell carcinomas. *Oncol Rep.* 2003; 10: 369-374.
38. Raats DA, de Bruijn MT, Steller EJ, Emmink BL, Borel-Rinkes IH, Kranenburg O. Synergistic killing of colorectal cancer cells by oxaliplatin and ABT-737. *Cell Oncol.* 2011; 34: 307-313.
39. Simonin K, N'Diaye M, Lheureux S, Loussouarn C, Dutoit S, Briand M, Giffard F, Brotin E, Blanc-Fournier C, Poulain L. Platinum compounds sensitize ovarian carcinoma cells to ABT-737 by modulation of the Mcl-1/Noxa axis. *Apoptosis.* 2013; 18: 492-508.
40. Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM, Huang DC. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell.* 2005; 17: 393–403.
41. Vela L, Gonzalo O, Naval J, Marzo I. Direct interaction of Bax and Bak proteins with Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins in living cells revealed by fluorescence complementation. *J Biol Chem.* 2013; 288: 4935-4946.
42. Ploner C, Kofler R, Villunger A. Noxa: at the tip of the balance between life and death. *Oncogene.* 2009; 27: S84–S92.
43. Bhajee F, Pepper DJ, Pitman KT, Bell D. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma: a review of current knowledge and future applications. *Head Neck.* 2012; 34: 894-899.
44. Kiang A, Yu MA, Ongkeko WM. Progress and pitfalls in the identification of cancer stem cell-targeting therapies in head and neck squamous cell carcinoma. *Curr Med Chem.* 2012; 19: 6056-6064.

45. Moncharmont C, Levy A, Gilormini M, Bertrand G, Chargari C, Alphonse G, Ardail D, Rodriguez-Lafrasse C, Magné N. Targeting a cornerstone of radiation resistance: cancer stem cell. *Cancer Lett.* 2012; 322 :139-147.
46. Takebe N, Harris PJ, Warren RQ, Ivy SP. Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011; 8: 97–106.
47. Skubitz AP, Taras EP, Boylan KL, Waldron NN, Oh S, Panoskaltsis-Mortari A, Vallera DA. Targeting CD133 in an in vivo ovarian cancer model reduces ovarian cancer progression. *Gynecol Oncol.* 2013; 130: 579–587.
48. Singh JK, Farnie G, Bundred NJ, Simões BM, Shergill A, Landberg G, Howell SJ, Clarke RB. Targeting CXCR1/2 significantly reduces breast cancer stem cell activity and increases the efficacy of inhibiting HER2 via HER2-dependent and -independent mechanisms. *Clin Cancer Res.* 2013; 19: 643–656.
49. Ginestier C, Liu S, Diebel ME, Korkaya H, Luo M, Brown M, et al. CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. *J Clin Invest.* 2010; 120: 485–497.
50. Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med.* 2006; 12: 1167–1174.
51. Sun S, Liu S, Duan SZ, Zhang L, Zhou H, Hu Y, Zhou X, Shi C, Zhou R, Zhang Z. Targeting the c-Met/FZD8 signaling axis eliminates patient-derived cancer stem-like cells in head and neck squamous carcinomas. *Cancer Res.* 2014; 74: 7546-7559.
52. Arnold CR, Abdelmoez A, Thurner G, Debbage P, Lukas P, Skvortsov S, Skvortsova II. Rac1 as a multifunctional therapeutic target to prevent and combat cancer metastasis. *Oncoscience.* 2014; 1: 513-521.
53. Signore M, Ricci-Vitiani L, De Maria R. Targeting apoptosis pathways in cancer stem cells. *Cancer Lett.* 2013; 338: 374-382.
54. Vellanki SH, Grabrucker A, Liebau S, Proepper C, Eramo A, Braun V, Boeckers T, Debatin KM, Fulda S. Small-molecule XIAP inhibitors enhance gamma-irradiation-induced apoptosis in glioblastoma. *Neoplasia.* 2009; 11: 743–752.
55. Zabolova R, McDermott L, Stantic M, Prokopova K, Dong LF, Neuzil J. CD133-positive cells are resistant to TRAIL due to up-regulation of FLIP. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 373: 567–571.
56. Lagadinou ED, Sach A, Callahan K, Rossi RM, Neering SJ, Minhajuddin M, Ashton JM, Pei S, Grose V, O'Dwyer KM, Liesveld JL, Brookes PS, Becker MW, et al. BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. *Cell Stem Cell.* 2013; 12: 329-341.
57. Baev D, Krawczyk J, O'Dwyer M, Szegezdi E. The BH3-mimetic ABT-737 effectively kills acute myeloid leukemia initiating cells. *Leuk Res Rep.* 2014; 3: 79–82.
58. Zeuner A, Francescangeli F, Contavalli P, Zapparelli G, Apuzzo T, Eramo, Baiocchi M, De Angelis ML, Biffoni M, Sette G, Todaro M, Stassi G, De Maria R. Elimination of quiescent/slow-proliferating cancer stem cells by Bcl-XL inhibition in non-small cell lung cancer. *Cell Death Differ.* 2014; 21: 1877-1888.
59. Koehler BC, Scherr AL, Lorenz S, Urbanik T, Kautz N, Elssner C, Welte S, Bermejo JL, Jäger D, Schulze-Bergkamen H. Beyond cell death - antiapoptotic Bcl-2 proteins regulate migration and invasion of colorectal cancer cells in vitro. *PLoS One.* 2013; 8: e76446.

60. Beuve M, Alphonse G, Maalouf M, Colliaux A, Battiston-Montagne P, Jalade P, Balanzat E, Demeyer A, Bajard M, Rodriguez-Lafrasse C. Radiobiologic parameters and local effect model predictions for head-and-neck squamous cell carcinomas exposed to high linear energy transfer ions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008; 71: 635-642.
61. Steel GG, Peckham MJ. Exploitable mechanisms in combined radiotherapy/chemotherapy: the concept of additivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1979; 5: 85-91.
62. Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev.* 2006; 58: 621-681.

Tables

Cell lines	SQ20B	Cal33	Cal27	SCC61
SF2	0.76	0.67	0.47	0.39
IC50 ABT-737 (μ M)	14.56 (\pm 1.67)	9.48 (\pm 1.01)	13.44 (\pm 1.37)	2.38 (\pm 0.38)
Protein expression (relative blot density to α -tubuline) ($\cdot 10^{-7}$)				
Bcl-2	1,11	4,28	1,89	3,94
Bcl-x _L	4,52	2,98	3,71	1,21
Mcl-1	4,70	7,66	5,85	2,09
Bax	3,20	7,40	8,23	2,84
Bak	1,44	1,53	2,15	2,51
PUMA	0,70	0,89	0,40	0,98

Table 1: Characteristics of human head and neck squamous cell lines.

Figure legends

Figure 1. Study of the sensitivity of four human HNSCC cell lines to ABT-737. (A) Correlation between the sensitivity to ABT-737 (IC₅₀) and the radiosensitivity of cell lines (SF2). (B) Expression of Bcl-2 family proteins of the four cell lines and the CSC sub-population (SP⁺/CD44^{high}/ALDH^{high}) was performed by Western blotting experiments. The correlation between sensitivity to ABT-737 (IC₅₀) and (C) Bak expression, or (D) Bcl-X_L expression were normalized to the expression of α -tubulin.

Figure 2. Radio-sensitization of HNSCC cell lines. (A) Four HNSCC cell lines were treated with 0.1 % DMSO (Control: Ctr) or 10 μ M ABT-737 (ABT-737) 20h after a 10 Gy irradiation. Cell death quantification was measured by the percentage of cells in the sub-G1 phase after 24h, 72h and 120h after treatment +/- irradiation. (B) The clonogenic assay was performed on the most radioresistant cell line, SQ20B. The survival fraction at 2 Gy (SF2) was 0.81 (+/- 0.15) for control cells, and decrease to a value of 0.60 (+/- 0.16) after treatment of cells with 10 μ M ABT-737. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.

Figure 3. Treatment with ABT-737 before X-ray exposure triggers radiation-induced intrinsic apoptosis in SQ20B cell line and intra-mitochondrial oxidative stress. SQ20B cells were treated with 0.1 % DMSO (Control: Ctr) or 10 μ M ABT-737, 20 h before a 10 Gy irradiation. After 24 h, 48 h, 72 h and 120 h, (A) cells were fixed and the percentage of TUNEL-positive cells were measured by flow cytometry analysis or (B) the percentage of cells having a caspase activity was measured on alive cells by flow cytometry analysis. (C) A Western blot analysis was performed to determine the specific activation of the procaspases-3 by cleavage. (D) The mitochondrial ROS production was validated with a positive (Antimycin A treated cells) control by fluorescence microscopy. Scale bar, 5 μ m. (E) Specific mitochondrial ROS production was investigated by flow cytometry analysis using the MitoSOX labeling. (F) The loss of mitochondrial outer membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was measured through a JC-1 staining on living cells. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Figure 4. ABT-737 combined with irradiation alters expression levels of Bcl-2 family members. Representative Western blot analysis of Bcl-2 family members were performed 24h after irradiation. Tubulin is shown as a loading control. Blots are representative of three independent experiments.

Figure 5. Treatment with ABT-737 increases X-ray-induced apoptosis of the SP⁺/CD44^{high}/ALDH^{high} cells sub-population. A SP⁺/CD44^{high}/ALDH^{high} sub-population sorted from the SQ20B cell line was treated with DMSO 0.1 % (Control: Ctr) or 10 μ M ABT-737 20 h before a 10 Gy irradiation. 24 h, 48 h, 72 h and 120 h after irradiation, (A) the percentage of sub-G1 cells and (B) the loss of mitochondrial outer membrane potential ($\Delta\Psi_m$) were measured by flow cytometry analysis. (C) The expression of Bcl-2 family proteins in the SP⁺/CD44^{high}/ALDH^{high} sub-population was performed by Western blot analysis, 7 hours and 24 hours after irradiation, respectively. Tubulin is shown as a loading control. Blots are representative of three independent experiments ***: $p < 0.001$.

Figure 6. Treatment with ABT-737 delays tumoral growth *in vivo*. Mice were treated intraperitoneally with 0.2 % DMSO (Control: Ctr) or with ABT-737 (20 mg/kg/day) 1 hour before irradiation of tumor xenografts (2 Gy/day; Ctr + 10 Gy and ABT-737 + 10 Gy) and this during 5 consecutive days. Tumor volume was monitored up to 40 days. * : $p < 0.05$.

Figures

Figure 1:

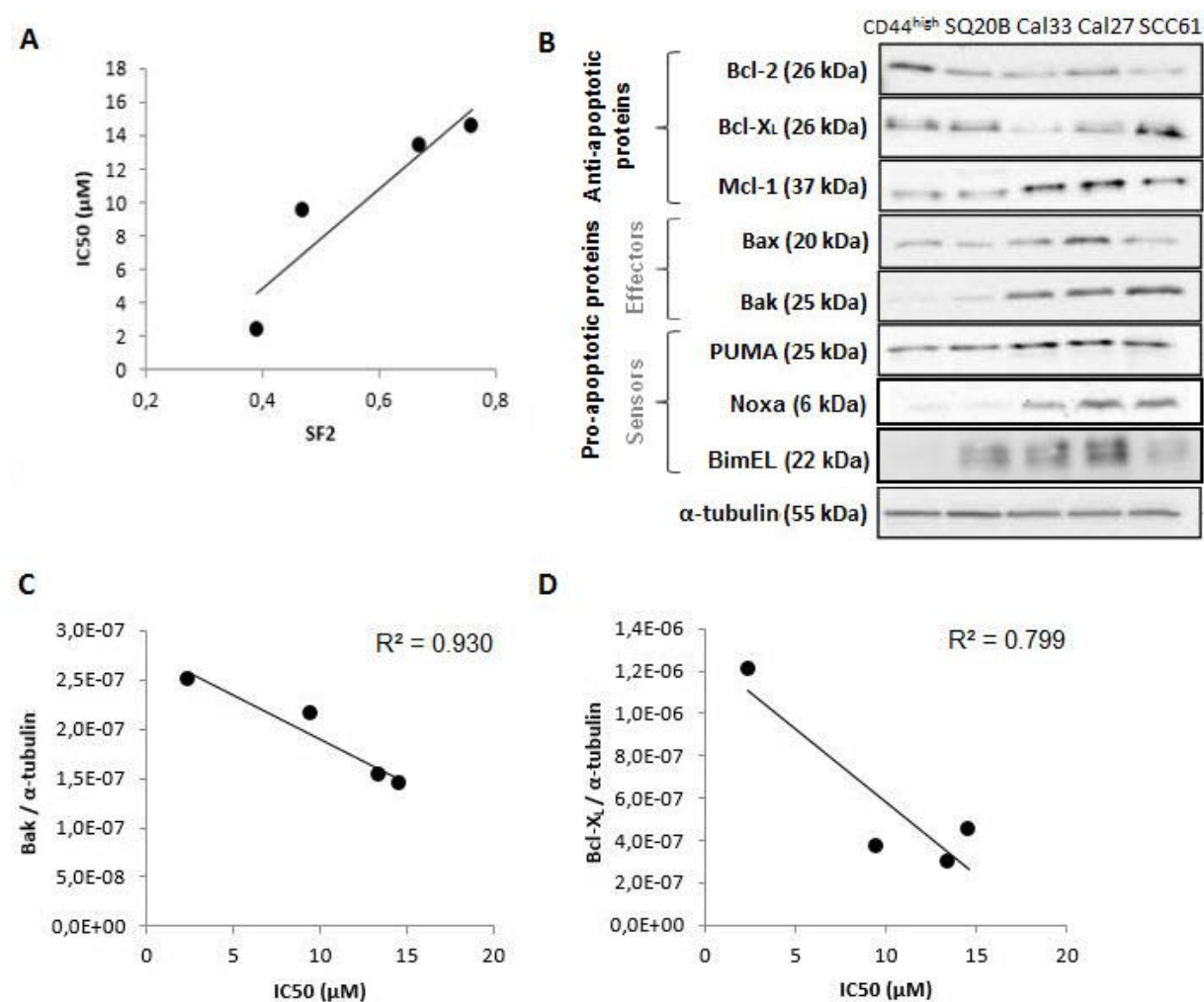


Figure 2:

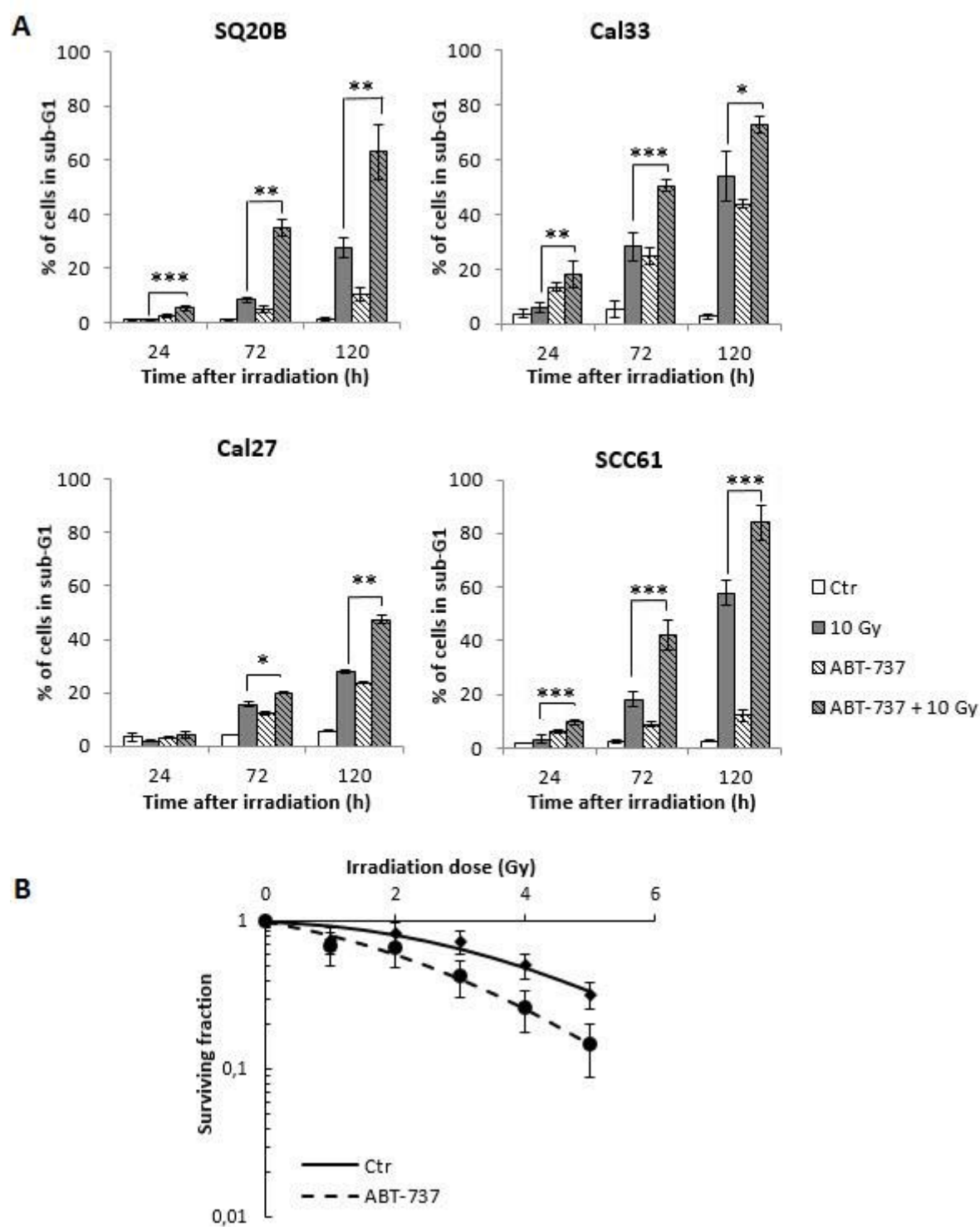


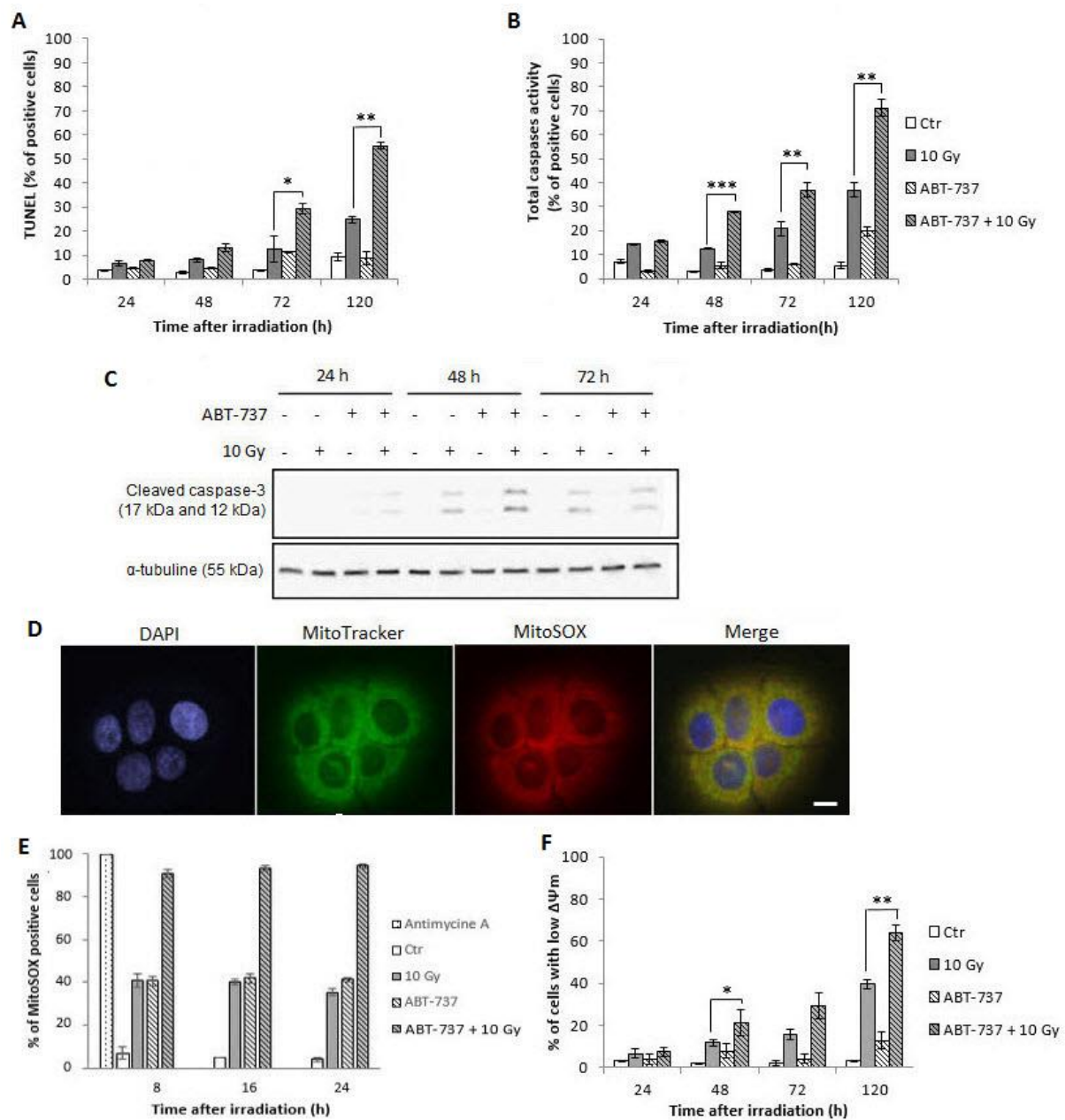
Figure 3:

Figure 4:

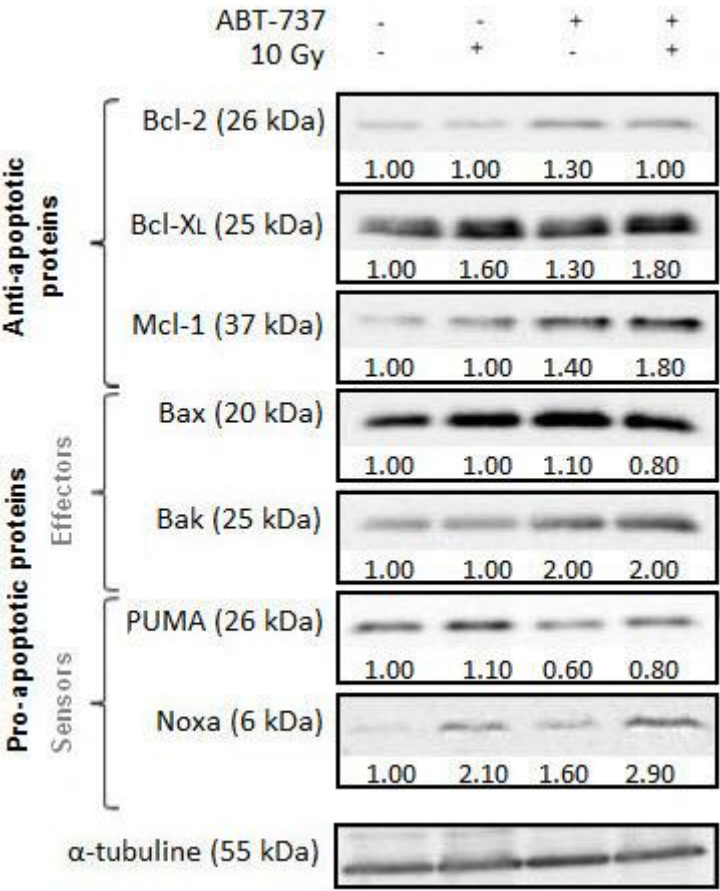


Figure 5:

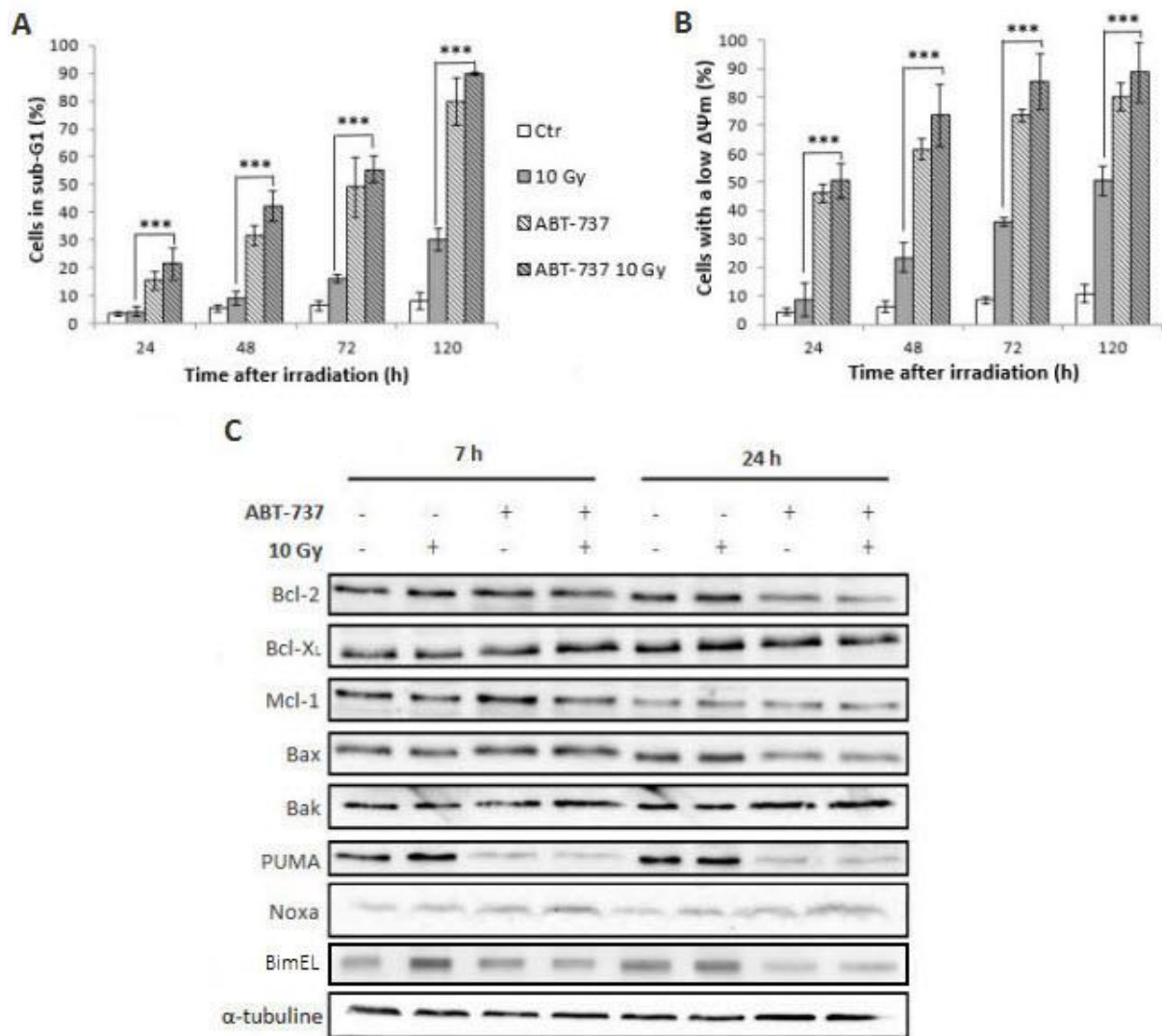
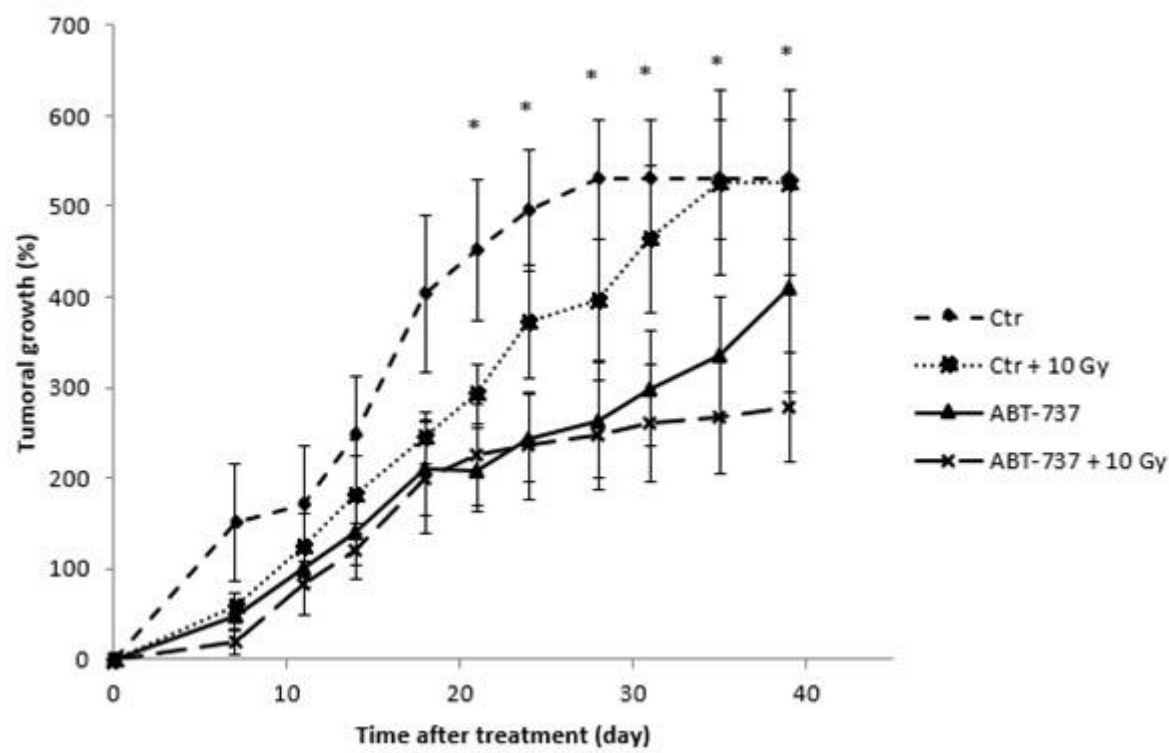


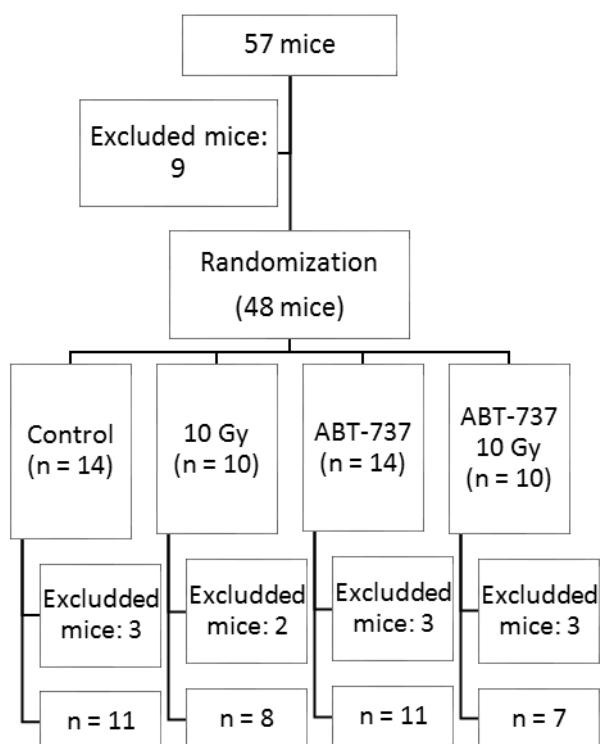
Figure 6:



Supplementary Data

<i>Irradiation dose (Gy)</i>	<i>Isobolographic analyze</i>	
	Survival 10 %	Survival 50 %
1	Additive	Additive
2	Synergistic	Synergistic
3	Synergistic	Synergistic
4	Synergistic	Synergistic
5	Synergistic	Synergistic

Supplementary Data 1. Isobolographic analyze on the SQ20B cell line.



Supplemental data 2. Randomization diagram. Before the randomization, 9 mice were excluded because of their low tumoral volume ($< 60 \text{ cm}^3$). The randomization and treatments were realized on 48 mice. After treatment, some mice were excluded for different reasons (important edema that modified the tumoral volume measurement, necrosis of tumor, tumoral volume $> 400 \text{ cm}^3$ at the first day after treatment).